



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

FACULTAD DE VETERINARIA

INSTITUTO UNIVERSITARIO DE SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

TESIS DOCTORAL

Estudio de microorganismos de la Clase *Mollicutes*

en organismos marinos.

Orestes Manuel Vega-Orellana

LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

2014



ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|----------|
| ÍNDICE GENERAL | I |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | VII |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | X |
| AGRADECIMIENTOS | XV |
| RESUMEN | XVII |
| ABSTRACT..... | XIX |
| ABREVIATURAS | XXI |
| | |
| CAPÍTULO I: Introducción, Objetivos y Revisión Bibliográfica | 1 |
| I.1 INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| I.2 OBJETIVOS..... | 4 |
| I.2.1 OBJETIVO GENERAL | 4 |
| I.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 4 |
| I.3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA..... | 5 |
| I.3.1 MOLLICUTES..... | 5 |
| I.3.1.1 <i>Características generales</i> | 5 |
| I.3.1.2 <i>Taxonomía y filogenia</i> | 7 |
| I.3.1.3 <i>Características ultraestructurales</i> | 13 |
| I.3.1.3.1 Estructura celular y cápsula | 14 |
| I.3.1.3.2 Membrana celular y estructura antigénica..... | 15 |
| I.3.2 TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MOLLICUTES | 16 |
| I.3.2.1 <i>Procedimientos preliminares (Tully y Whitcomb, 1995; Ramírez, 1999)</i> | 16 |
| I.3.2.1.1 Cultivo puro | 16 |
| I.3.2.1.2 Ausencia de pared celular..... | 17 |
| I.3.2.1.3 Detección de formas L bacterianas..... | 17 |
| I.3.2.1.4 Morfología de las colonias..... | 17 |
| I.3.2.1.5 Requerimientos de esteroides | 18 |
| I.3.2.2 <i>Métodos bioquímicos y enzimáticos</i> | 18 |
| I.3.2.2.1 Hidrólisis de la urea | 19 |
| I.3.2.2.2 Hidrólisis de azúcares | 19 |
| I.3.2.2.3 Hidrólisis de la arginina | 22 |
| I.3.2.2.4 Actividad de la fosfatasa | 23 |

| | |
|--|-----------|
| I.3.2.2.5 Reducción del Tetrazolium | 23 |
| I.3.2.2.6 Formación de películas y cristales | 24 |
| I.3.2.3 <i>Perfiles de proteínas totales</i> | 25 |
| I.3.2.4 <i>Métodos serológicos</i> | 25 |
| I.3.2.4.1 Inhibición de crecimiento | 25 |
| I.3.2.4.2 Inhibición del metabolismo | 25 |
| I.3.2.5 <i>Inmunofluorescencia</i> | 26 |
| I.3.2.6 <i>Inmunohistoquímica</i> | 27 |
| I.3.2.7 <i>Métodos de biología molecular</i> | 27 |
| I.3.2.7.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa – PCR | 27 |
| I.3.2.7.2 Secuenciación de ADN | 28 |
| I.3.2.7.3 PCR a tiempo real..... | 30 |
| I.3.2.7.4 DGGE..... | 30 |
| I.3.2.7.5 <i>Microarrays</i> | 31 |
| I.3.2.7.6 Tipificación | 32 |
| I.3.3 HÁBITATS Y ENFERMEDADES..... | 36 |
| I.3.3.1 <i>Patogenicidad y factores de virulencia</i> | 39 |
| I.3.3.2 <i>Enfermedades más importantes producidas por mollicutes</i> | 40 |
| I.3.4 MOLLICUTES Y ORGANISMOS ACUÁTICOS..... | 45 |
| I.3.4.1 <i>Invertebrados</i> | 45 |
| I.3.4.2 <i>Peces</i> | 50 |
| I.3.4.2.1 <i>Mycoplasma mobile</i> | 53 |
| I.3.4.3 <i>Mamíferos marinos</i> | 58 |
| | |
| CAPITULO II: Estudio metodológico – Evaluación de la sensibilidad y especificidad de seis pares de cebadores utilizados en la detección e identificación de microorganismos de la Clase <i>Mollicutes</i> | 65 |
| II.1 ANTECEDENTES..... | 65 |
| II.2 MATERIALES Y MÉTODOS..... | 70 |
| II.2.1 ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO | 70 |
| II.2.2 EXTRACCIÓN Y MEDICIÓN DE ADN..... | 70 |
| II.2.3 CONFIRMACIÓN DE LA IDENTIDAD DEL ADN | 74 |
| II.2.4 COMPARACIÓN DE SEIS PARES DE CEBADORES (PCR'S)..... | 75 |
| II.2.5 PRUEBAS DE ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD DE LAS PCR'S | 75 |

| | |
|--|-----------|
| II.2.5.1 Pruebas de especificidad..... | 75 |
| II.2.5.2 Pruebas de sensibilidad | 76 |
| II.2.6 PCR A TIEMPO REAL | 77 |
| II.3 RESULTADOS..... | 78 |
| II.3.1 ORGANISMOS Y ADN..... | 78 |
| II.3.2 ESPECIFICIDAD..... | 78 |
| II.3.2.1 <i>Mollicutes</i> | 78 |
| II.3.2.2 <i>Bacterias no-mollicutes</i> | 79 |
| II.3.3 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD | 81 |
| II.3.4 CÁLCULO DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD | 82 |
| II.4 DISCUSIÓN | 84 |
| II.4.1 CEBADORES .. | 85 |
| II.4.2 ESPECIES UTILIZADAS | 87 |
| II.4.3 MOLLICUTES..... | 89 |
| II.4.4 BACTERIAS NO-MOLLICUTES | 92 |
| II.4.5 SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD..... | 93 |
| II.4.6 PCR A TIEMPO REAL | 95 |
| CAPÍTULO III: Microorganismos de la Clase <i>Mollicutes</i> en organismos marinos. | 99 |
| III.1 ANTECEDENTES | 99 |
| III.1.1 MAMÍFEROS MARINOS | 99 |
| III.1.1.1 <i>Importancia y situación del estudio de mamíferos marinos.....</i> | 99 |
| III.1.1.2 <i>Origen de las muestras de mamíferos marinos utilizadas</i> | 101 |
| III.1.1.2.1 Cetáceos..... | 101 |
| III.1.1.2.2 Pinnípedos de la Isla Decepción (Antártica) | 102 |
| III.1.2 INVERTEBRADOS Y PECES MARINOS | 103 |
| III.1.2.1 <i>Importancia y situación del estudio de invertebrados y peces marinos.</i> | 103 |
| III.1.2.2 <i>Origen de las muestras de invertebrados y peces marinos utilizadas.</i> | 104 |
| III.1.2.2.1 Invertebrados marinos..... | 104 |
| III.1.2.2.2 Peces | 105 |
| III.2 METODOLOGÍA..... | 106 |
| III.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO..... | 106 |
| III.2.1.1 <i>Cetáceos</i> | 106 |
| III.2.1.2 <i>Pinnípedos de la Antártica.....</i> | 107 |

| | | |
|-------------|---|-----|
| III.2.1.3 | <i>Peces marinos</i> | 108 |
| III.2.1.4 | <i>Invertebrados marinos</i> | 109 |
| III.2.1.4.1 | <i>Medusas</i> | 109 |
| III.2.1.4.2 | <i>Cefalópodos</i> | 110 |
| III.2.2 | PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS | 110 |
| III.2.2.1 | <i>Filtración y verificación del crecimiento bacteriano</i> | 110 |
| III.2.2.2 | <i>Clonación</i> | 111 |
| III.2.2.3 | <i>Mantenimiento y almacenamiento de los cultivos</i> | 111 |
| III.2.3 | TÉCNICAS DE GENÉTICA MOLECULAR | 115 |
| III.2.3.1 | <i>Extracción de ADN</i> | 115 |
| III.2.3.2 | <i>PCR (Polymerase Chain Reaction) a tiempo real</i> | 115 |
| III.2.3.3 | <i>PCR para secuenciación</i> | 115 |
| III.2.3.4 | <i>Secuenciación y análisis de las secuencias</i> | 119 |
| III.2.3.5 | <i>DGGE (Denatured Gradient Gel Electrophoresis)</i> | 120 |
| III.2.4 | PRUEBAS DE CRECIMIENTO (Cefalópodos) | 121 |
| III.2.5 | PRUEBAS BIOQUÍMICAS | 121 |
| III.2.6 | ANÁLISIS HISTOLÓGICOS (Cefalópodos) | 122 |
| III.3 | RESULTADOS | 123 |
| III.3.1 | MAMÍFEROS MARINOS | 123 |
| III.3.1.1 | <i>Cetáceos</i> | 123 |
| III.3.1.2 | <i>Pinnípedos de la Antártica</i> | 133 |
| III.3.2 | INVERTEBRADOS Y PECES MARINOS | 141 |
| III.3.2.1 | <i>Peces marinos</i> | 143 |
| III.3.2.2 | <i>Invertebrados marinos</i> | 145 |
| III.3.2.2.1 | <i>Medusas</i> | 145 |
| III.3.2.2.2 | <i>Cefalópodos</i> | 147 |
| III.4 | DISCUSIÓN | 163 |
| III.4.1 | DE LA METODOLOGÍA EMPLEADA | 163 |
| III.4.2 | DE LOS MAMÍFEROS MARINOS ESTUDIADOS | 165 |
| III.4.2.1 | <i>Cetáceos</i> | 165 |
| III.4.2.2 | <i>Pinnípedos de la Antártica</i> | 171 |
| III.4.2.2.1 | <i>Uso de la ISR y DGGE</i> | 174 |
| III.4.3 | DE LOS PECES E INVERTEBRADOS MARINOS | 175 |
| III.4.3.1 | <i>Peces</i> | 175 |

| | |
|--|------------|
| III.4.3.2 Invertebrados | 178 |
| III.4.3.2.1 Medusas | 178 |
| III.4.3.2.2 Cefalópodos | 180 |
| CAPÍTULO IV: Conclusiones | 191 |
| CAPÍTULO V: Anexos | 195 |
| V.1 MOLLICUTES EN ORGANISMOS ACUÁTICOS | 195 |
| V.1.1 MOLLICUTES EN BRIOZOOS, CNIDARIOS Y CTENÓFOROS. | 195 |
| V.1.2 MOLLICUTES EN MOLUSCOS..... | 196 |
| V.1.3 MOLLICUTES EN CRUSTÁCEOS..... | 197 |
| V.1.4 MOLLICUTES EN PECES..... | 198 |
| V.1.5 MOLLICUTES EN PINNÍPEDOS Y SIRÉNIDOS | 200 |
| V.1.6 MOLLICUTES EN CETÁCEOS..... | 202 |
| V.2 PROTOCOLOS Y MATERIALES..... | 203 |
| V.2.1 PROTOCOLO: Toma de muestras en cetáceos para la identificación de mollicutes...203 | |
| V.2.2 MEDIOS DE CULTIVO..... | 204 |
| V.2.2.1 Medio de colecta y transporte..... | 204 |
| V.2.2.2 Medios de aislamiento:..... | 204 |
| V.2.2.2.1 FRIIS (Ross y Whittlestone, 1983)..... | 204 |
| V.2.2.2.2 PH (Kirchhoff y Rosengarten, 1984) | 205 |
| V.2.2.2.3 SP4-II (Ramírez et al., 1997)..... | 206 |
| V.2.2.3 Medios para la caracterización bioquímica de mollicutes (Poveda, 1998)..... | 208 |
| V.2.3 REACTIVOS Y SOLUCIONES..... | 210 |
| V.2.3.1 Solución protectora para liofilización | 210 |
| V.2.3.2 Reactivos de la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización | 210 |
| V.2.4 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN | 210 |
| V.3 PCR's | 212 |
| V.3.1 PCR'S ESPECÍFICAS PARA LA DETECCIÓN DE MOLLICUTES. | 212 |
| V.3.1.1 Hotzel y colaboradores (2003). | 212 |
| V.3.1.2 Spargser y colaboradores (2002)..... | 212 |
| V.3.1.3 Mc Auliffe y colaboradores (2005)..... | 213 |
| V.3.1.4 Van Kuppeveld y colaboradores (1992)..... | 213 |
| V.3.1.5 Botes y colaboradores (2005)..... | 214 |

| | |
|--|------------|
| V.3.2 GENES RIBOSÓMICOS Y REGIONES INTERGÉNICAS | 214 |
| V.3.2.1 Yavari (2010). Gen ARNr 16S..... | 214 |
| V.3.2.2 Poveda (2012). Gen ARNr 23S..... | 215 |
| V.3.2.3 Ramírez y colaboradores (2008). ISR | 216 |
| V.3.2.4 Ramírez y colaboradores (2010). ISR2 | 216 |
| V.4 OTROS | 217 |
| V.4.1 ANTECEDENTES DE LOS CETÁCEOS UTILIZADOS..... | 217 |
| V.4.2 ALINEAMIENTO de la secuencia del gen ARNr 16S entero de “ <i>Candidatus</i> <i>Mycoplasma corallicola</i> ”, Myc-POTA 5H y Myc-PULPO PE. | 220 |
| V.4.3 CORTES HISTOLÓGICOS DE POTA (<i>Todarodes sagittatus</i>)..... | 221 |
| V.4.4 COMUNICACIONES ORIGINADAS | 223 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 225 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----|
| Tabla I-1: Diferencias entre mollicutes, bacterias y virus (Howard y Gourlay, 1978)..... | 9 |
| Tabla I-2 : Descripción de la Clase <i>Mollicutes</i> (Brown et al., 2010F) | 12 |
| Tabla II-1: Especies de microorganismos de la Clase <i>mollicutes</i> utilizadas en la comparación de seis pares de cebadores de PCR's utilizadas para esta clase..... | 71 |
| Tabla II-2: Especies de bacterias no-mollicutes utilizadas en la comparación de seis pares de cebadores de PCR's..... | 73 |
| Tabla II-3: Pares de cebadores comparados, nombre y secuencia de los cebadores, tamaño del amplicón amplificado y su referencia. | 76 |
| Tabla II-4: Diluciones, unidades formadoras de colonias (UFC) y concentración de ADN de <i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i> (Y-GOAT) (MMC) y <i>Acholeplasma laidlawii</i> (PG8) (ACO) utilizadas para las pruebas de sensibilidad de los seis pares de cebadores comparados..... | 81 |
| Tabla II-5: Límite de las diluciones de ADN de <i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i> (Y-GOAT) (MMC) y <i>Acholeplasma laidlawii</i> (PG8) (ACO) detectado por los seis pares de cebadores comparados y en dos PCR's a tiempo real..... | 82 |
| Tabla II-6: Especificidad, sensibilidad y valores predictivos para cada PCR utilizada para la detección de mollicutes (nivel de confianza de 95%) empleando el <i>software</i> win-epi 2.0 (de Blas, 2006), versión <i>online</i> del <i>software</i> win episcopes 2.0 (Thrusfield et al., 2001)..... | 83 |
| Tabla III-1: Pares de cebadores utilizados para la amplificación del gen ARNr 23S (Poveda et al., 2012)..... | 119 |
| Tabla III-2: Cetáceos varados en las Islas Canarias o Almería entre los años 2010-2013 utilizados en el estudio de identificación de mollicutes..... | 126 |
| Tabla III-3: Secuencia del gen ARNr 16S de <i>Acholeplasma axanthum</i> AJ311394 (93% - gen ARNr 16S) detectado en ojo y pulmón de un zifio de true, <i>Mesoplodon mirus</i> y su porcentaje de similitud con otras especies..... | 127 |
| Tabla III-4: Secuencia de la ISR de <i>Mycoplasma</i> sp. Phocoena c-264-gen (97% -ISR) detectado en dos ejemplares de delfín listado, <i>Stenella coeruleoalba</i> (en mama y vulva en uno y en oído, ojo, pulmón, abertura genital y articulación artrítica, en el otro), y su porcentaje de similitud con otras especies..... | 127 |
| Tabla III-5: Secuencia del gen ARNr 16S de <i>Mycoplasma</i> sp. phocoena c-264-gen (99% - gen ARNr 16S) detectado en dos ejemplares de delfín listado, <i>Stenella coeruleoalba</i> (en mama y vulva | |

| | |
|--|-----|
| en uno y en oído, ojo, pulmón, abertura genital y articulación artrítica, en el otro), y su porcentaje de similitud con otras especies | 130 |
| Tabla III-6: Secuencia de un fragmento del gen ARNr 16S de <i>Mycoplasma</i> sp. CSL7529-conjuntiva (99% - gen ARNr 16S) detectado en el ano de un delfín común, <i>Delphinus delphis</i> y su porcentaje de similitud con otras especies. | 130 |
| Tabla III-7: Secuencia de un fragmento del gen ARNr 16S de <i>Mycoplasma</i> sp. AB703210 (98% - gen ARNr 16S) detectado en el espiráculo de un cachalote pigmeo, <i>Kogia breviceps</i> y su porcentaje de similitud con otras especies. | 132 |
| Tabla III-8: Distribución de las especies de mollicutes encontradas en pinnípedos provenientes de la Isla Decepción (Antártica) según el hospedador y el origen de las muestras (b: boca; v: vagina). MZ: <i>Mycoplasma zalophi</i> (99% - ISR); MZD: <i>m. zalophidermidis</i> (99% - ISR); MC: <i>m. sp.</i> CSL7529-conjuntiva (99% - ISR); MM1: <i>M. sp.</i> Mirounga es2805-ORL (99% - ISR); MM2: <i>M. sp.</i> Mirounga es2774-NASSP4 (91%-ISR); ML: <i>M. lipofasciens</i> ATCC 35015 (78% - ISR). | 133 |
| Tabla III-9: Secuencia de la ISR de <i>Mycoplasma zalophi</i> detectado en boca y vagina de lobo marino antártico, <i>Arctophoca gazella</i> , y en boca de foca de weddell, <i>Leptonychotes weddellii</i> , y elefante marino, <i>Mirounga leonina</i> , de la isla decepción (antártica) y su porcentaje de similitud con otras especies. | 136 |
| Tabla III-10: Secuencia de la ISR de <i>Mycoplasma zalophidermidis</i> detectado en vagina de lobo marino antártico, <i>Arctophoca gazella</i> , de la Isla Decepción (Antártica) y su porcentaje de similitud con otras especies. | 137 |
| Tabla III-11: Secuencia de la ISR de <i>Mycoplasma</i> sp. CSL7529-conjuntiva detectado en boca y vagina de lobo marino antártico, <i>Arctophoca gazella</i> , de la Isla Decepción (Antártica) y su porcentaje de similitud con otras especies. | 137 |
| Tabla III-12: Secuencia de la ISR de <i>Mycoplasma</i> sp. Mirounga ES2805-ORL detectado en vagina de foca de weddell, <i>Leptonychotes weddellii</i> , de la Isla Decepción (Antártica) y su porcentaje de similitud con otras especies. | 138 |
| Tabla III-13: Secuencia de la ISR de <i>Mycoplasma</i> sp. Mirounga es2774-nassp4 (91% - ISR) detectado en boca de foca de weddell, <i>Leptonychotes weddellii</i> , de la Isla Decepción (Antártica) y su porcentaje de similitud con otras especies. | 138 |
| Tabla III-14: Secuencia de la ISR de <i>Mycoplasma lipofasciens</i> strain ATCC 35015 (78% - ISR) detectado en boca de foca de weddell, <i>Leptonychotes weddellii</i> , y elefante marino, <i>Mirounga leonina</i> , de la Isla Decepción (Antártica) y su porcentaje de similitud con otras especies | 139 |

| | |
|--|-----|
| Tabla III-15: Porcentajes de similitud entre las especies de micoplasma aisladas de muestras tomadas en pinnípedos de la Isla Decepción (Antártica)..... | 139 |
| Tabla III-16: Caracterización bioquímica de los micoplasmas provenientes de muestras tomadas en pinnípedos de la Isla Decepción (Antártica)..... | 141 |
| Tabla III-17: Invertebrados y peces utilizados en el estudio de identificación de mollicutes. | 142 |
| Tabla III-18: Detalle del origen, estado de desarrollo, especies y número total y de muestras positivas de los peces empleados en el presente estudio. | 143 |
| Tabla III-19: Secuencia de un fragmento del gen ARNr 16S de <i>Spiroplasma</i> sp. detectado en ejemplares de medusa, <i>Pelagia noctiluca</i> | 146 |
| Tabla III-20: Resultados de las muestras obtenidas de pulpo. | 148 |
| Tabla III-21: Secuencia del gen ARNr 16S, ISR y gen ARNr 23S de Myc-PULPO PE proveniente de pulpo (<i>Octopus vulgaris</i>) y su porcentaje de similitud con otras especies. | 154 |
| Tabla III-22: Secuencia del gen ARNr 16S, ISR, gen ARNr 23S y ISR2 de Myc -POTA 5H proveniente de pota (<i>Todarodes sagittatus</i>) y su porcentaje de similitud con otras especies. | 156 |
| Tabla III-23: Caracterización bioquímica de micoplasmas (Myc-PULPO y Myc -POTA) provenientes de muestras obtenidas en esófago (PE) e glándula digestiva (PG) de pulpo (<i>Octopus vulgaris</i>); y en branquias (5H y 6H) e intestino (7H) de dos potas (<i>Todarodes sagittatus</i>). ... | 161 |
| Tabla III-24: Crecimiento a diferentes temperaturas de cultivo de micoplasmas (Myc-PULPO y Myc -POTA) provenientes de muestras obtenidas en esófago (PE) de pulpo (<i>Octopus vulgaris</i>); y en branquias (5H) de pota (<i>Todarodes sagittatus</i>)..... | 161 |
| Tabla III-25: Crecimiento a diferentes salinidades y dos temperaturas de cultivo (18 °C y 25 °C) de micoplasmas (Myc-PULPO y Myc -POTA) provenientes de muestras obtenidas en esófago (PE) de pulpo (<i>Octopus vulgaris</i>); y en branquias (5H) de pota (<i>Todarodes sagittatus</i>)..... | 162 |
| Tabla III-26: Número de muestras analizadas (total, de positivas e identificadas) por cada grupo y la secuencia utilizada para la identificación específica de mollicutes en ellas. | 162 |
| Tabla III-27: Informe de necropsia de dos ejemplares de delfín listado (<i>Stenella coeruleoalba</i>) que presentaron <i>Mycoplasma</i> sp. Phocoena C-264-GEN (97% ISR y 99% gen ARNr 16S)..... | 170 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|-----|
| Figura I-1: Colonias típicas en forma de “huevo frito” de <i>Acholeplasma laidlawii</i> (40X)..... | 7 |
| Figura I-2: Agrupación filogenética de la Clase <i>Mollicutes</i> (Wang et al., 2004B) | 13 |
| Figura I-3: Esquema de la estructura celular de un mollicutes | 14 |
| Figura II-1: Curva de disociación obtenida por PCR a tiempo real empleando cebadores específicos para la detección de la Clase <i>Mollicutes</i> basados en un fragmento del gen ARNr 16S (Van Kuppeveld et al., 1992). Las flechas indican las curvas de su mismo color, siendo: C+ : control positivo [<i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i> (Y-GOAT)]; C- : control negativo (agua); M+ : ADN de mollicutes; B : ADN de bacterias no-mollicutes..... | 79 |
| Figura II-2: Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos de PCR del fragmento del gen ARNr 16S con los cebadores indicados por Spargler y colaboradores (2002). Se muestra un gel con productos de mollicutes y bacterias no-mollicutes. El producto amplificado es de aproximadamente 580 pb. C+ : control positivo [<i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i> (Y-GOAT)]; C- : control negativo (agua)..... | 80 |
| Figura II-3: Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos de PCR de la ISR de bacterias no-mollicutes y <i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i> (Y-GOAT) (MMC) utilizando los cebadores indicados por Ramírez y colaboradores (2008). Ec : <i>Escherichia coli</i> ; Se : <i>Salmonella enterica</i> sv <i>enteridis</i> ; Sa : <i>Streptococcus agalactiae</i> ; Lg : <i>Lactococcus garvieae</i> 8831; Va : <i>Vibrio</i> <i>anguillarum</i> ; Pd : <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> ; As : <i>Aeromonas</i> spp. ; Pa : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; Bc : <i>Bacillus cereus</i> ; Sta : <i>Staphylococcus aureus</i> . El marcador molecular es válido para ambos geles. | 80 |
| Figura III-1: Toma de muestras de un delfín listado (<i>Stenella coeruleoalba</i>) en las instalaciones de la Facultad de Veterinaria de la ULPGC (A). Introducción de un hisopo estéril en el ano (B). También fueron tomadas muestras de las articulaciones que mostraban artritis (C). Los hisopos eran inoculados inmediatamente en tubos conteniendo 2 ml del cultivo general RPMI- 1640 suplementado con 10% de suero equino (fuente de colesterol) e incubados a 37 °C en condiciones aeróbicas (D). | 107 |
| Figura III-2: Ejemplares de Lobo marino antártico <i>Arctophoca gazella</i> (A), Foca de Weddell <i>Leptonychotes weddellii</i> (B) y Elefante marino <i>Mirounga leonina</i> (C). Fotos de ARKIVE (http://www.arkive.org)..... | 108 |

- Figura III-3:** Fueron obtenidas muestras de ejemplares de lubina (*Dicentrarchus labrax*) (A), lenguado (*Solea senegalensis*) (B), dorada (*Sparus aurata*) (C) y atún (*Thunnus thynnus*) (D). Fotos de FishBase (<http://www.fishbase.org>). 109
- Figura III-4:** Toma de muestras de ejemplares de medusa luminiscente, *Pelagia nocticula*, durante varamientos naturales en la playa “Las Canteras” (Gran Canaria, España) (A, B y C). Su procesamiento consistió en agrupar individuos (D y E), triturarlos (F) y filtrarlos (G) para su posterior inoculación en tubos con el medio SP4-II al 1,5% de cloruro sódico (H). 112
- Figura III-5:** Toma de muestras de ejemplares de carabela portuguesa, *Physalia physalis*, durante varamientos naturales en la playa “Las Canteras” (Gran Canaria, España) (A y B). Su procesamiento consistió en agrupar individuos (C), triturarlos (D) y filtrarlos (E) para su posterior inoculación en tubos con el medio SP4-II al 1,5% de cloruro sódico. 113
- Figura III-6:** Ejemplar de pota (*Todarodes sagittatus*)..... 113
- Figura III-7:** Toma de muestras de un ejemplar de pulpo (*Octopus vulgaris*) (A): Disección (B) y el muestreo por arrastre usando un hisopo estéril en las branquias (C), esófago (D), ojos (E) y glándula digestiva (F)..... 114
- Figura III-8:** Representación esquemática de los cebadores indicados por Van Kuppeveld y colaboradores (1992)^a y Spergser y colaboradores (2002)^b. R: Regiones complementarias. 117
- Figura III-9:** Representación esquemática de los cebadores utilizados para amplificar el gen ARNr 16S (Yavari, 2010) y la región intergénica ISR (cebadores 16S+C y 23S-B) (Ramírez et al., 2008). R: Regiones complementarias. 117
- Figura III-10:** Representación esquemática de los cebadores utilizados para amplificar el gen ARNr 23S (Poveda et al., 2012). R: Regiones complementarias. 118
- Figura III-11:** Representación esquemática de los cebadores utilizados para amplificar la región intergénica ISR2 (Ramírez et al., 2010). R: Regiones complementarias..... 118
- Figura III-12:** Curva de disociación obtenida por PCR a tiempo real usando cebadores específicos para la detección de mollicutes basados en un fragmento del gen ARNr 16S (Van Kuppeveld et al., 1992). Las flechas indican las curvas de su mismo color, siendo: **C+**: control positivo (*M. mycoides* subsp. *capri* (Y-GOAT)); **C-**: control negativo (agua); **M+**: muestras positivas; **M-**: muestra negativa. 123
- Figura III-13:** Colonias del aislamiento de *Acholeplasma axanthum* AJ311394 (93% - gen ARNr 16S) con proveniente del pulmón de un zifio de True, *Mesoplodon mirus*. (40X). 124
- Figura III-14:** Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos de PCR de los tres fragmentos del gen ARNr 16S entero (Yavari, 2010) de una muestra de cetáceos varados en las Islas Canarias entre los años 2010-2013. **C+**: control positivo (*M. mycoides* subsp. *capri*

| | |
|--|-----|
| (Y-GOAT)); C- : control negativo (agua); A : fragmento A (desde el inicio del gen hasta 580 pb); | |
| B : fragmento B (510 hasta 1050 pb); C : fragmento C (980 pb hasta el final del gen). | 125 |
| Figura III-15: Árboles filogenéticos en base a las secuencias del gen ARNr 16S y con el método de Neighbor-Joining (1000 repeticiones), donde se muestra la posición de <i>Acholeplasma axanthum</i> AJ311394 (93%- gen ARNr 16S) aislado en ojo y pulmón de un zifio de True, <i>Mesoplodon mirus</i> , con respecto de representantes de los grupos filogenéticos y en el caso del grupo <i>Anaeroplasma</i> , los representantes de sus “clusters”. En el recuadro se muestra un detalle de los “clusters” más cercanos. | 128 |
| Figura III-16: Alineamiento de la secuencia de la ISR de <i>Mycoplasma</i> sp. Phocoena C-264-GEN (97% - ISR) aislado en dos ejemplares de delfín listado, <i>Stenella coeruleoalba</i> . Se comparan los dos aislamientos en la mama y vulva del primero y del genital del segundo. Son 100% similares. | 129 |
| Figura III-17: Árboles filogenéticos en base a las secuencias del gen ARNr 16S y con el método de Neighbor-Joining (1000 repeticiones), donde se muestra la posición de <i>Mycoplasma</i> sp. Phocoena C-264-GEN (99% - gen ARNr 16S) aislado en dos ejemplares de delfín listado, <i>Stenella coeruleoalba</i> (en mama y vulva en uno y en oído, ojo, pulmón, vulva y articulación artrítica, en el otro) con respecto de representantes de los grupos filogenéticos y en el caso del grupo <i>M. hominis</i> , los representantes de sus “clusters”. En el recuadro se muestra un detalle de los “clusters” más cercanos. | 131 |
| Figura III-18: Colonias de los mollicutes encontrados en pinnípedos provenientes de la isla Decepción (Antártica) MZ : <i>Mycoplasma zalophi</i> ; MZD : <i>M. zalophidermidis</i> ; MC : <i>M. sp.</i> CSL7529-conjuntiva; MM1 : <i>M. sp.</i> Mirounga ES2805-ORL; MM2 : <i>M. sp.</i> Mirounga ES2774-NASSP4 (91% - ISR); ML : <i>M. lipofasciens</i> ATCC 35015 (78% - ISR).40X..... | 134 |
| Figura III-19: Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos de PCR de la región entre los genes ARNr 16S y 23S (Ramírez et al., 2008) de muestras tomadas en pinnípedos de la isla Decepción (Antártica). C+ : control positivo (<i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i> (Y-GOAT)); C- : control negativo (agua); B1 : tamaño de banda 1; B2 : tamaño de banda 2; DB : doble banda; Marcador molecular y el tamaño (pares de bases) de cada banda..... | 135 |
| Figura III-20: Electroforesis en gel de DGGE de productos de una PCR específica para la clase <i>Mollicutes</i> basada en un fragmento del gen ARNr 16S (McAuliffe et al., 2005) provenientes de muestras obtenidas en pinnípedos de la isla Decepción (Antártica). MZD : <i>M. zalophidermidis</i> ; MZ : <i>Mycoplasma zalophi</i> ; MC : <i>M. sp.</i> CSL7529-conjuntiva; ML : <i>M. lipofasciens</i> ATCC 35015 (78%-ISR); MM2 : <i>M. sp.</i> Mirounga ES2774-NASSP4 (91%- ISR); MM1 : <i>M. sp.</i> Mirounga ES2805-ORL | 136 |

- Figura III-21:** Alineamientos de las secuencias de la ISR de los seis tipos de micoplasmas provenientes de muestras tomadas en pinnípedos de la isla Decepción (Antártica). **MZ:** *Mycoplasma zalophi*; **MM2:** *M. sp.* Mirounga ES2774-NASSP4 (91%-ISR); **MZD:** *M. zalophidermidis*; **MC:** *M. sp.* CSL7529-conjunctiva; **ML:** *M. lipofasciens* ATCC 35015 (78% - ISR); **MM1:** *M. sp.* Mirounga ES2805-ORL. 140
- Figura III-22:** Curva de disociación obtenida por PCR a tiempo real usando cebadores específicos para la detección de mollicutes basados en un fragmento del gen ARNr 16S (Van Kuppeveld et al., 1992). Las flechas indican las curvas de su mismo color correspondientes a las muestras positivas a la presencia de micoplasmas: Myc-PULPO (PG y PE) y las muestras de intestino y branquias de dos ejemplares de dorada (*Sparus aurata*) y sus respectivas temperaturas de fusión (°C). **C+:** control positivo (*M. mycoides* subsp. *capri* (Y-GOAT)) y **C-:** control negativo (agua). 144
- Figura III-23:** Alineamiento de la secuencia parcial del gen ARNr 16S amplificado con los cebadores indicados por Spargser y colaboradores (2002) de dos muestras de medusas. Cada una de ellas proviene de un muestreo diferente y son 100% similares. 147
- Figura III-24:** Colonias de los mollicutes encontrados muestras tomadas en esófago (PE) de pulpo (*Octopus vulgaris*) (Myc-PULPO); y en branquias (5H) de pota (*Todarodes sagittatus*) (Myc-POTA). 40X. 148
- Figura III-25:** Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos de PCR de la ISR. En el gel A y B se encuentran las muestras de esófago (**PE**) y glándula digestiva (**PG**), y de estómago (**PS**), respectivamente, de un ejemplar de pulpo común (*Octopus vulgaris*). En el gel C se observan las muestras de branquias (**5H**) y en branquias (**6H**) e intestino (**7H**) de dos ejemplares de pota (*Todarodes sagittatus*). El marcador molecular de los geles A y B es el mismo. El gel B se rige por el marcador molecular del gel C. 149
- Figura III-26:** Alineamiento de la secuencia de la ISR de las tres muestras de pota **5H** (branquias), **6H** (branquias) y **7H** (intestino) provenientes de las proximidades de la Isla Canaria de “El Hierro” donde fueron aislados mollicutes. Su similitud es del 100%, por lo que la especie de las tres muestras es denominada genéricamente como Myc-POTA. 150
- Figura III-27:** Alineamiento de la secuencia de la ISR de Myc-POTA 5H y Myc-PULPO PE. Su similitud es del 72,1%. 151
- Figura III-28:** Cromatograma de la parte de la secuencia de Myc-POTA analizada por la aplicación *BLASTn*. Este fragmento de la secuencia se corresponde con dos zonas conservativas de la ISR, Box A y Box B. Debajo se muestra un alineamiento de parte de la secuencia ISR de micoplasmas aviares donde pueden observarse dichas zonas. 152

| | |
|---|-----|
| Figura III-29: Alineamiento de la secuencia del gen ARNr 16S entero de dos muestras de pota 5H (branquias) y 6H (branquias). Su similitud es del 100%. Ambas especies fueron denominadas Myc-POTA..... | 155 |
| Figura III-30: Alineamiento de la secuencia del gen ARNr 16S entero de Myc-POTA 5H y Myc-PULPO PE. Su similitud es del 98,6 %..... | 157 |
| Figura III-31: Alineamiento de la secuencia de la región intergénica entre los genes ARNr 23S y ARNr 5S (ISR2) entre Myc-POTA 5H y Myc-PULPO PE..... | 158 |
| Figura III-32: Árboles filogenéticos en base a las secuencias del gen ARNr 16S y con el método de Neighbor-Joining (1000 repeticiones), donde se muestra la posición de los micoplasmas aislados de cefalópodos Myc-PULPO y Myc-POTA representantes de los grupos filogenéticos y en el caso del grupo <i>M. hominis</i> , los representantes de sus “clusters”. En el recuadro se muestra un detalle de las especies más cercanas..... | 159 |
| Figura III-33: Electroforesis en gel de <i>DGGE</i> de productos de una PCR específica para la clase <i>Mollicutes</i> basada en un fragmento del gen ARNr 16S (McAuliffe et al., 2005) provenientes de muestras tomadas en esófago (PE) y glándula digestiva (PG) de pulpo (<i>Octopus vulgaris</i>) (Myc-PULPO); y en branquias (5H y 6H) e intestino (7H) de dos potas (<i>Todarodes sagittatus</i>) (Myc-POTA)..... | 160 |

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis Doctoral no hubiera sido posible sin la participación de diversas personas que me han brindado apoyo y me han animado durante su ejecución y redacción. Aún a riesgo de olvidar a alguien me gustaría citar de manera muy especial:

A mi madre **María Orellana Ramírez** y abuela **Hilda Ramírez Quiroga**, por todo el apoyo incondicional sentimental y logístico eterno para la realización de mis metas y vida!!! Más que gracias!!! A mi hermana Sara y familiares a distancia.

A mis tutores Dr. **José Bismarck Poveda Guerrero** y Dra. **Ana Sofía Ramírez Corbera** por brindarme la oportunidad de estudiar todo el campo de la micoplasmología y ofrecerme los conocimientos y medios para la realización de este trabajo. Especialmente a Ana Sofía su apoyo incondicional y su inquebrantable optimismo, profesionalidad y gran amistad durante todos estos años. Gracias por haberme insertado en el rico mundo de la biología molecular y sus consejos y ayuda como tutora y amiga.

A todos los grupos de investigación del **IUSA** y cada uno de sus integrantes, los que siempre me apoyaron cuando se los solicité. A **Mercedes** por su disponibilidad, buen humor y ayuda siempre. Al GIA el que, a través del Dr. **Daniel Montero**, Dr. **Juan Stefanell** y Dr. **Juan Socorro**, generosamente me cedió muestras de algunos de sus experimentos. A los grupos de **Enfermedades Infecciosas** y de **Genética** que no dudaron en cederme muestras o dejarme utilizar sus equipos cuando fue necesario. A **Josué Díaz Delgado** y a todo el equipo de cetáceos. Gracias a **Ester**, por su magnífica asistencia técnica, disponibilidad y experiencia.

Agradecimientos

A dos grandes investigadores y hermanos de corazón, **Rachid Ganga** y **Eneko Ganuza Taberna**, su compañía, amistad y apoyo siempre han sido increíbles!!! Gracias!!!.

A mis colegas de laboratorio y grandes profesionales y amigos: **Carlos Poveda Turrado**, **Alejandro Suárez Pérez**, **Rubén Sebastián Rosales Santana**, **Borja Díaz Gutiérrez** y **Emmanuel Martín Díaz**. En diferentes épocas pero todas llenas de trabajo, aprendizaje y amistad.

A tod@s l@s “compis” que han estado siempre dándome su apoyo y compañía: **Javi Roo**, **Silvia**, **Alex**, **Moneiba**, **Ada**, **Valentina**, **Lidia**, **Judith**, **Jimena**, **Fatma**, **Lita**, **Lorena**, **Belinda**, **Fatma Saara**, **Davinia**, **Ana**, **Manola**, **Andrea**. A **Carmen Quintana**, una colega, amiga y gran técnico, por su apoyo durante las diferentes fases de mi doctorado. Gracias!!!

A quienes fuera del trabajo han sido mi apoyo y compañía durante mi vida en Canarias, **Jonatan Díaz Quintana**, Fabio Fabres, Sergio Formoso, Borja, Jaime, Lukas, Mario Pérez, Francisco Vargas, mi primo Jojô, Ulises, José Tur, Carmelo, Miguel, Juan Pulpo, Néstor, Pablito, Remi Lender, Manolo; Vane, Nati, Yraida, Idaira, Bea, Carol, Chris, Janaina, Waldo, Meyling, Antía, Olga, Carola, Víctor, Dudu, Manolo, Silvia Italiana, Andreja, familia Sambadailha, alumn@s de los gyms... y a la distancia: Adilson, Karine, Glaucya, Carola, Víctor capitán, Adriana y much@s más.. ..

ለክላላችሁ ጽሑፍ ለሰጡ ሰጡ ማሻሻሪያ ጽሑፍ ሰጡ ጽሑፍ ለክላላችሁ ጽሑፍ

{Hannon le. Galad hendu nîn. Gerich veleth nin. Daniel, hannon le}

RESUMEN

La presente tesis describe el estudio de microorganismos de la Clase *Mollicutes* en organismos marinos. El primer capítulo corresponde a la justificación, a una revisión bibliográfica de las bases teóricas del estudio, así como sus objetivos propuestos. El segundo capítulo concierne a la elección de la pareja de cebadores de Van Kuppeveld y colaboradores (1992) para la detección de mollicutes a través de una PCR a tiempo real. Fueron escogidos por su adecuada especificidad y sensibilidad después de compararlos con otros cuatro pares de cebadores específicos para la detección de mollicutes indicados por otros autores. El tercer capítulo relata la metodología y resultados de la búsqueda de mollicutes en 72 cetáceos varados en el Archipiélago Canario entre los años 2010-2013, 80 pinnípedos de la Antártica (2010-2011), 112 peces de acuicultura o del medio natural, 12 grupos de 20 a 40 medusas y 9 cefalópodos. Para su detección e identificación fueron utilizadas técnicas rutinarias de cultivo de mollicutes y de genética molecular. El análisis de la secuencia entera o de fragmentos de los genes ARNr 16S y ARNr 23S, así como de la región intergénica entre ellos (ISR) fue una valiosa herramienta para la identificación taxonómica de las especies encontradas, cuando fue posible. En los cetáceos fueron identificadas cuatro especies de mollicutes: *Mycoplasma* sp. CSL7529-conjunctiva (99% - gen ARNr 16S) encontrada en un delfín común, *Delphinus delphis*; *Mycoplasma* sp. Phocoena C-264-GEN (97%- ISR), en dos delfines listados *Stenella coeruleoalba*; *Mycoplasma* sp. AB703210 (98%- gen ARNr 16S), en un cachalote pigmeo *Kogia breviceps*; y *Acholeplasma axanthum* AJ311394 (93%- gen ARNr 16S), en un zifio de True *Mesoplodon mirus*. Adicionalmente, fueron detectados mollicutes en: *Balaenoptera borealis*, *Globicephala macrorhynchus*, *Stenella frontalis*, *Tursiops truncatus*, *Physeter macrocephalus*, *Mesoplodon europaeus* y *Ziphius cavirostris*; sin embargo no fue posible su identificación específica debido a la poca cantidad de ADN disponible. En los pinnípedos de la Antártica fueron aisladas, cultivadas e identificadas seis especies de mollicutes: *M. zalophidermidis* (99% - ISR) y *M. sp.* CSL7529-conjunctiva (99% - ISR) en el lobo marino antártico *Arctophoca gazella*; *M. sp.*

Resumen

Mirounga ES2805-ORL (99% - ISR) y *M. sp.* Mirounga ES2774-NASSP4 (91%- ISR) en focas de Weddell *Leptonychotes weddellii*; *M. lipofasciens* ATCC 35015 (78% - ISR) en focas de Weddell y en el elefante marino *Mirounga leonina*; y *M. zalophi* (99% - ISR) encontrado en las tres especies. En ninguno de los casos fue posible establecer algún tipo de relación entre la presencia de mollicutes y patologías presentes. Por otra parte, fueron detectados mollicutes en dos ejemplares de dorada *Sparus aurata* (branquia e intestino) pero no pudieron ser identificados ni cultivados. En las medusa *Pelagia nocticula* fue detectado un *Spiroplasma sp.*, mientras que en el pulpo común (*Octopus vulgaris*) y en pota (*Todarodes sagittatus*) fueron detectadas, identificadas, aisladas y cultivadas dos especies de mollicutes nuevas, siendo denominadas Myc-PULPO y Myc-POTA, respectivamente. Ambas están relacionadas entre sí pero son muy diferentes a las especies ya conocidas.

ABSTRACT

The present thesis describes the study of microorganisms belonging to *Mollicutes* class in marine organisms. Chapter I consists of an updated literature review related to the theoretical basis of the study and its objectives. Chapter II explains the primers pairs (Van Kuppeveld et al., 1992) used to detect mollicutes using a real-time PCR technique. The latter were chosen based on their adequate specificity and sensitivity in comparison with four other counterparts specific to mollicutes detection as reported by other authors. Chapter III describes the methodology and results of the screening for mollicutes in 72 cetaceans stranded from Canary Islands during the period between 2010 and 2013, 80 Antarctic pinnipeds (2010-2011), 112 farmed or wild fish, 12 pool of 20 to 40 jellyfish, and 9 cephalopods, using microbiological routine culture and molecular biology techniques. The analysis of the entire or partial sequence of 16S rRNA and 23S rRNA genes, as well as the intergenic space region between the latter (ISR), was a valuable tool for the taxonomic identification of the species found, when it was possible. Therefore, in cetaceans, four species of mollicutes were identified including, *Mycoplasma* sp. CSL7529 conjunctiva (99% - 16S rRNA gene) found in a common dolphin, *Delphinus delphis*; *Mycoplasma* sp. Phocoena C-264-GEN (97% - ISR), two striped dolphins *Stenella coeruleoalba*; *Mycoplasma* sp. AB703210 (98% - 16S rRNA gene), a pygmy sperm whale *Kogia breviceps*; and *Acholeplasma axanthum* AJ311394 (93% - 16S rRNA gene) in a True's beaked whale *Mesoplodon mirus*. In addition, mollicutes were also detected in *Balaenoptera borealis*, *Globicephala macrorhynchus*, *Stenella frontalis*, *Tursiops truncatus*, *Physeter macrocephalus*, *Mesoplodon europaeus* and *Ziphius cavirostris*; however due to the limited amount of DNA material available, no further species identification was performed. Six mollicutes species were isolated, cultivated and identified in Antarctic pinnipeds including *M. zalophidermidis* (99% - ISR) and *M. sp.* CSL7529 - conjunctiva (99% - ISR) in Antarctic fur seal *Arctophoca gazella*; *M. sp.* Mirounga ES2805 - ORL (99% - ISR) and *M. sp.* Mirounga ES2774 - NASSP4 (91% - ISR) in

Abstract

Weddell seals *Leptonychotes weddellii* ; *M. lipofasciens* ATCC 35015 (78% - ISR) in Weddell seals and elephant seals *Mirounga leonina* ; and *M. zalophi* (99% - ISR) found in the three species. No relationship could not be established between the presence of mollicutes and pathologies in all the cases. Moreover, mollicutes were detected in gilthead seabream *Sparus aurata* (gill and intestine) but could not be identified or cultured. Similarly, *Spiroplasma* sp. was detected in jellyfish *Pelagia nocticula*. Interestingly, two new mollicutes species were detected, identified, isolated and cultured in common octopus (*Octopus vulgaris*) and squid (*Todarodes sagittatus*) and were called Myc-PULPO and Myc-POTA, respectively. Both latter species are related to each other, being very different from the known (published) species.

ABREVIATURAS

A: Adenina.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNr: Ácido desoxirribonucleico ribosómico.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNr: Ácido ribonucleico ribosómico.

ARNt: Ácido ribonucleico de transferencia.

C: Citosina.

DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*): Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización.

g: Fuerza de gravedad.

g: Gramo.

G: Guanina.

h: Hora.

ISR (*Intergenic space region*): Región entre los genes ARNr 16S y ARNr 23S.

ISR2: Región entre los genes ARNr 23S y ARNr 5S.

M: Adenina o citosina.

M: Molar.

mA: Miliamperio.

MC: *Mycoplasma* sp. CSL7529-conjuntiva.

Abreviaturas

mg: Milígramo.

min: Minuto.

ml: Mililitro.

ML: *Mycoplasma lipofasciens* ATCC 35015 (78%- ISR).

mm: Milímetro.

mM: Milimolar.

MM1: *Mycoplasma* sp. Mirounga ES2805-ORL.

MM2: *Mycoplasma* sp. ES2774-NASSP4 (91%- ISR).

MZ: *Mycoplasma zalophi*

MZD: *Mycoplasma zalophidermidis*

pb: Pares de bases.

PCR (*Polymerase Chain Reaction*): Reacción en cadena de la polimerasa.

s: Segundo.

UFC: Unidades formadoras de colônias.

V: Voltios.

W: Adenina o timina.

Y: Citosina o timina.

μl: Microlitro.

μm: Micrómetro.

μM: Micromolar

CAPÍTULO I: Introducción, Objetivos y Revisión bibliográfica

I.1 INTRODUCCIÓN

Los microorganismos pertenecientes a la clase *Mollicutes* son los organismos más pequeños capaces de replicarse en medios de cultivo exentos de células. Se distinguen de otras bacterias por su reducido tamaño y la ausencia total de pared celular.

Hasta ahora, el término **micoplasma** ha sido empleado como sinónimo de la clase *Mollicutes*, pero también para referirse únicamente a los miembros del género *Mycoplasma*. Según Brown y colaboradores (2010F) esta tendencia ha de evitarse, por lo que en la presente tesis para incluir a todas las especies de la clase *Mollicutes*, se empleará el término mollicutes; y micoplasma, acholeplasma, ureaplasma, mesoplasma, spiroplasma, etc., sólo para designar el género en cuestión.

Todos los mollicutes son parásitos o comensales de vertebrados, insectos o plantas, encontrándose también algunas especies patógenas dentro de estos tres grupos, sin embargo sus mecanismos de patogenicidad todavía causan controversia (Weisburg et al., 1989; Neimark et al., 2001; Brown et al., 2010F). La presencia y efectos de este grupo taxonómico han sido ampliamente estudiados en animales de producción, humanos, reptiles, plantas y artrópodos, sin embargo los estudios realizados en organismos acuáticos son escasos. Se ha identificado algunas especies particulares en invertebrados marinos (Zimmer y Woollacott, 1983; Boyle et al., 1987; Chaiyapechara et al., 2011; Chen et al., 2011A), en peces (Kirchhoff et al., 1987; Holben et al., 2002; Bano et al., 2007; McIntosh et al., 2008) y también en mamíferos marinos (Ruhnke y Madoff, 1992; Higgins, 2000; Foster et al., 2011; Volokhov et al., 2011). Sin embargo, el papel que juegan en la mayoría de las especies acuáticas no está del todo claro, identificándose solamente dos especies de mollicutes patógenas para crustáceos marinos en cultivos intensivos.

Considerando que estas especies pueden afectar a organismos inmunodeprimidos, ser facilitadores para la entrada de otras enfermedades, o incluso ser

patógenas, es bastante importante detectarlas, identificarlas y caracterizar su rol dentro de las especies donde se encuentran. En el caso de organismos que son explotados comercialmente (peces, crustáceos, moluscos) identificar las bacterias asociadas y analizar su papel ecológico puede ayudar en la elaboración de protocolos de manejo o medidas sanitarias a ser aplicadas en su explotación, considerando sobre todo el estrés que puede producirse en sistemas de cultivo intensivos y que llevan a la aparición de enfermedades (Pulsford et al., 1994; Krogdahl y Bakke-McKellep, 2005; Morgan y Tromborg, 2007). En el caso de mamíferos marinos, la detección de mollicutes es útil, teniendo en cuenta que han sido detectadas especies patógenas que pueden afectar poblaciones naturales. Adicionalmente, este conocimiento puede sumarse a la información ya conocida, ayudando a entender la fisiología y ecología de especies de pinnípedos y cetáceos protegidas o en riesgo, y auxiliando a la hora de realizar programas de manejo y protección basados en parámetros biológicos.

En Canarias, el estudio de *Mollicutes* es llevado a cabo por el **Grupo de Epidemiología y Medicina Preventiva** – del Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria – (**IUSA**) de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria – (**ULPGC**). Las líneas de investigación abarcan el aislamiento, identificación y caracterización de especies de mollicutes en rumiantes, porcinos y aves. Para tal propósito el Grupo cuenta con protocolos eficientes de cultivo así como de las más avanzadas técnicas de biología y genética molecular para su detección y caracterización, contando con una gran experiencia en el área y la ejecución de proyectos locales e internacionales en conjunto con diversas universidades.

Es necesario destacar que dentro del IUSA también se encuentran tres importantes grupos de investigación dirigidos al estudio de organismos marinos: El **Grupo de Enfermedades Infecciosas e Ictiopatología**, que trabaja en el diagnóstico y prevención de enfermedades bacterianas y víricas en pequeños rumiantes y en especies piscícolas utilizadas en acuicultura; el **Grupo de Investigación en Acuicultura** – GIA, que enfoca su trabajo y estudios al desarrollo de protocolos eficientes de cultivo de

especies acuáticas con potencial económico en Canarias, abarcando las áreas de manejo, reproducción, nutrición y alimentación en cada una de las fases de producción; y la **División de Histología y Patología Animal** que trabaja en la identificación y diagnóstico de mamíferos marinos varados en las costas de Canarias, evaluándolos sanitariamente en un estudio centrado a conocer las causas de su muerte. Todos estos grupos están bien consolidados en sus áreas de actuación, sin embargo, no abarcan entre sus líneas de investigación el área de micoplasmología.

La planificación y elaboración de la presente tesis fue desarrollada tomando en consideración todo lo anterior, además de los recursos técnicos y humanos que posee el IUSA, así como la importancia de generar más conocimiento a través de la apertura de nuevas líneas de investigación y la posibilidad de incrementar el conocimiento que ya se tiene de los organismos acuáticos. Todo el trabajo ha sido desarrollado íntegramente bajo la dirección del Grupo de Epidemiología y Medicina Preventiva, contando con el aporte de muestras del GIA, de la División de Histología y Patología Animal y del Grupo de Enfermedades Infecciosas e Ictiopatología del IUSA. Por otra parte, hay que destacar que también se trabajó con muestras microbiológicas de pinnípedos, obtenidas en la Antártica y cedidas por el **Laboratorio Central de Veterinaria de Algete** (Madrid). Adicionalmente, también se contó con la colaboración del Dr. Rubén S. Rosales (*Veterinary Laboratories Agency - Department for Environment Food and Rural Affairs*, Londres) y la Dra. Janet M. Bradbury (*Veterinary School - University of Liverpool*, Liverpool) quienes cedieron diferentes especies y cepas de mollicutes, además de aportar su experiencia en el área.

I.2 OBJETIVOS

I.2.1 OBJETIVO GENERAL

Detectar, aislar y caracterizar especies de microorganismos de la Clase *Mollicutes* presentes en organismos marinos.

I.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desarrollar y/o adaptar protocolos para el muestreo, aislamiento, detección e identificación de mollicutes procedentes de organismos marinos a través de técnicas de cultivo y de biología molecular.

Detectar, aislar y caracterizar especies de *Mollicutes* presentes en los tejidos de mamíferos marinos varados en las costas de Canarias.

Detectar, aislar y caracterizar especies de *Mollicutes* presentes en muestras de boca y vagina de pinnípedos muestreados en Isla Decepción (Antártica).

Detectar, aislar y caracterizar especies de *Mollicutes* presentes en peces e invertebrados marinos.

I.3 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I.3.1 MOLLICUTES

I.3.1.1 Características generales

Los mollicutes son los microorganismos con capacidad de replicación en medios de cultivo exentos de células más pequeños que se conocen. Pertenecen a la División *Tenericutes*, que está compuesta por una única clase, la Clase *Mollicutes* (Edward et al., 1967; Razin y Freundt, 1984; Brown, 2010). La ausencia de pared celular le da el nombre a esta clase taxonómica *Mollicutes*, del latín *mollis* (fina) + *cutis* (piel). Son bacterias fácilmente distinguibles de las restantes por su pequeño tamaño (0,1 y 0,25 μm) y por carecer de pared celular debido a su incapacidad de sintetizar peptidoglucanos. Lo anterior hace que sean resistentes a la penicilina y sus derivados; y al mismo tiempo, sensibles a la lisis por choque osmótico y anticuerpos específicos sin mediación del complemento en pruebas de inhibición de crecimiento, así como a los detergentes y alcoholes. Son bacterias pleomórficas, presentando formas esféricas, de matraz (*flask-shaped*), las cuales pueden medir entre 200 y 500 ηm de diámetro; o formas ramificadas o incluso filamentos helicoidales, que pueden llegar a medir incluso 2.000 ηm . La mayoría de los mollicutes son anaerobios facultativos, sin embargo, también existen especies anaerobias estrictas. Se replican por fisión binaria, aunque la replicación del genoma puede preceder a la división citoplasmática, llevando a la formación de filamentos multinucleados. Poseen un genoma de pequeño tamaño (580 a 2200 kpb) y un bajo contenido de Guanina + Citosina (23-34 mol %) encontrándose el mayor porcentaje (40 mol %) en *Mycoplasma pneumoniae* y *Asteroleplasma anaerobium* (Brown et al., 2010E). El genoma de estos microorganismos es el menor de todos los organismos vivos conocidos por lo que son muy dependientes de su hospedador para cubrir sus requerimientos nutricionales (Fraser et al., 1995). Los mollicutes presentan un ciclo del ácido tricarboxílico incompleto y carecen de quinonas o citocromos, lo que impide que se lleve a cabo el proceso de fosforilación oxidativa, la ruta metabólica que produce ATP con mayor rendimiento (Miles, 1992; Brown et al., 2010F). Generalmente,

emplean azúcares o arginina como fuente principal de energía, aunque algunas especies pueden emplear ambas, o bien fuentes alternativas como piruvato y/o ácidos orgánicos. Por otra parte, el colesterol es un requerimiento para el crecimiento de algunos de estos microorganismos (Miles y Lee, 1983; Miles y Agbanyim, 1998; Brown et al., 2010F)

A diferencia de otras bacterias, la mayoría de mollicutes presentan sólo una o dos copias de los genes ARN ribosómico (ARNr), encontrándose el caso excepcional del género *Mesoplasma* que presenta tres. El gen ARNr 5S es notablemente menor en número de nucleótidos, y el número de genes ARNt es menor al de otras bacterias. La ARN-polimerasa es resistente a la rifampicina y en algunos géneros el codón UGA codifica triptófano en lugar de ser una señal de terminación (Brown et al., 2010F).

Estas bacterias pueden crecer en medios artificiales que les proporcionen esteroides y les satisfagan otros requerimientos nutricionales y físicos especiales. Las colonias formadas en estos medio de cultivo miden en su mayoría menos de 1 mm de diámetro y tienen el aspecto característico de “huevo frito” cuando se observan al microscopio (**Figura VIII-1**) debido a que la tendencia de la colonia es crecer penetrando en el medio sólido para después hacerlo superficialmente (Poveda,1998).

La mayoría de los mollicutes son inmóviles, encontrándose como excepciones a todas las especies del género *Spiroplasma* (Trachtenberg, 2006; Wada y Netz, 2009; Yu et al., 2009), además de *Mycoplasma (M.) pneumoniae* (Bredt et al., 1970), *M. gallisepticum* (Erdmann, 1976), *M. pulmonis*, (Bredt y Radestock, 1977), *M. genitalium*, (Taylor-Robinson y Bredt, 1983), *M. mobile* (Kirchhoff et al., 1984) y *M. amphoriforme* (Hatchell et al., 2006).

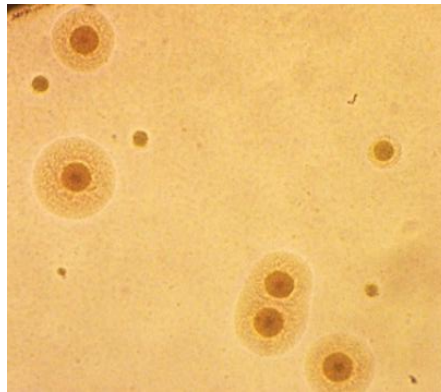


Figura VIII-1: Colonias típicas en forma de “huevo frito” de *Acholeplasma laidlawii* (40X).

1.3.1.2 Taxonomía y filogenia

La taxonomía se ocupa de la clasificación de los seres vivos, es decir, de su nomenclatura y ordenamiento en taxones, mientras que la filogenia es la ciencia que estudia las relaciones evolutivas entre las distintas especies, reconstruyendo la historia de su diversificación desde el origen de la vida en la tierra hasta la actualidad (Tortora et al., 2007).

El gen ARNr 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas (Rosselló-Mora y Amann, 2001; Rodicio y Mendoza, 2004). Algunas de las razones por las que se utiliza son que: **a)** es una molécula muy antigua y está en todas las bacterias actuales; **b)** su estructura y función han permanecido sin alteraciones durante un tiempo prolongado, de manera que las alteraciones en su secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios; **c)** su tamaño relativamente grande (~1500 nucleótidos) minimiza las fluctuaciones estadísticas; y **d)** su fácil secuenciación favorece que hayan bases de datos en continuo crecimiento (Rodicio y Mendoza, 2004). Otra característica por la que se considera un excelente marcador es

que entre las regiones conservadas en su gen se encuentran regiones variables que permiten detectar un amplio número de individuos filogenéticamente diversos. Por otro lado, la posibilidad de divergencia intragenómica por una posible transferencia horizontal de genes ribosómicos es prácticamente nula (Atlas y Philips, 2005). No obstante, el análisis del gen del ARNr 16S refleja la filogenia de los microorganismos, pero no su evolución (Rosselló-Mora y Amann, 2001).

La aplicación del gen ARNr 16S como cronómetro molecular fue propuesta por Carl Woese a principios de los años `70 (Woese and Fox, 1977; Woese, 1987). Sus estudios originaron la división de los procariotas en dos reinos: Eubacteria y Archaeobacteria, así como sus divisiones mayores y subdivisiones. Desde entonces, y en paralelo con el desarrollo y perfeccionamiento de las técnicas de biología y genética molecular, el análisis del gen ARNr 16S se ha utilizado para establecer las relaciones filogenéticas entre especies bacterianas, incidiendo directamente en su clasificación e identificación así como en la determinación de su historia evolutiva (Rodicio y Mendoza, 2004). Dentro de este sistema se definió la especie bacteriana como el “conjunto de cepas que comparten una similitud del 70% ó más en experimentos de hibridación ADN-ADN”. Stackebrandt y Goebel (1994) afirmaron que cepas con este nivel de relación presentaban una identidad del 97% ó más entre sus genes ARNr 16S, de tal manera que aquellas que tuvieran valores menores era improbable que estuvieran relacionadas. Sin embargo, con el tiempo se observó que existían cepas que compartían una similitud menor del 50% en experimentos de hibridación y que eran clasificadas como especies diferentes, pero que presentaban una identidad del 99% al 100% en el referido gen. Rosselló-Mora y Amann (2001) sugieren que el gen ARNr 16S carece de resolución filogenética a nivel de especies, considerando especie procariota el grupo de organismos que muestran un elevado grado de similitud global y que difieren claramente de otras especies.

Por ello, actualmente se recomienda que la identificación taxonómica sea polifásica, esto es, basada en criterios fenotípicos y al mismo tiempo en datos de

secuenciación genómica (Stackebrandt et al., 2002). Aunque se considera que el término especie polifásica es un sinónimo inadecuado del concepto fenético de especie (Rosselló-Mora, 2003).

El caso de los mollicutes no es simple, ya que son un grupo de bacterias que ha creado controversia y confusión a la hora de establecer su identidad y estatus taxonómico. Hasta los años 30 se les consideró virus, ya que podían atravesar filtros que otras bacterias no lo hacían. Más de 50 años después se volvió a repetir el mismo error al considerarse como virus a mollicutes encontrados en pacientes con SIDA (Lo, 1986). En 1935, el descubrimiento de formas L o variantes en fase L (bacterias que han perdido entera o parcialmente la pared celular) de cultivos de *Streptobacillus moniliformis* (Klienenberger, 1935) creó una gran confusión respecto al estado taxonómico independiente de los mollicutes, lo que duró hasta finales de los años 60 cuando se introdujeron los primeros análisis genómicos (Razin, 1992). Posteriormente, se sugirió que podían estar clasificados entre los virus y las bacterias debido a algunas claras diferencias que existen entre los tres, aunque hasta ahora no se ha encontrado una razón de peso para ello (Tabla VIII-1).

Tabla VIII-1: Diferencias entre Mollicutes, Bacterias y Virus (Howard y Gourlay, 1978).

| Características | Mollicutes | Bacterias | Virus |
|-------------------------------------|------------|-----------|-------|
| Contienen ADN y ARN a la vez | + | + | - |
| Poseen varios sistemas metabólicos | + | + | - |
| Se reproducen en medios sin células | + | + | - |
| Atravesan filtros de 0,22 µm | + | - | + |
| Presentan pared celular | - | + | - |
| Sensibles a la penicilina | - | + | - |
| Sensibles a la tetraciclina | + | + | - |

Junto con el desarrollo y perfeccionamiento de las técnicas de biología molecular y el análisis secuencial del gen ARNr 16S fue posible caracterizar los mollicutes (Woese et al., 1980; Johansson et al., 1998), determinándose que forman un grupo coherente de organismos derivados de los clostridios (bacterias Gram Positivas), por evolución regresiva y reducción del genoma, produciéndose así células de vida libre y auto-replicantes menores y más simples (Woese et al., 1985; Trachtenberg, 1998).

Basados en la filogenia del gen ARNr 16S la Clase *Mollicutes* fue en un comienzo situada en la división *Firmicutes* (Garrity et al., 2007), sin embargo, debido a estudios posteriores basados en marcadores genéticos alternativos (subunidad β de la ARN-polimerasa, chaperonina GroEL, algunas diferencias entre las aminoacils ARNt-sintetasas y las subunidades F0F1-ATPasa) y a la ausencia de pared celular, fueron finalmente situados dentro de la División *Tenericutes*, quedando así registrado en la 2ª Edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* de 2009 (Ludwig y Schleifer, 2005; Ludwig et al., 2009).

Gracias a estudios filogenéticos, fisiológicos y de genética molecular ha sido posible reorganizar la taxonomía de la Clase *Mollicutes* (**Tabla VIII-2**) (Tully y Whitcomb, 1995; Brown et al., 2010F). De esta manera, ha sido dividida en cuatro órdenes subdivididos a su vez en familias, basadas en el hábitat, requerimientos de esteroleos para crecer, tamaño del genoma y tolerancia al oxígeno (Freundt, 1955; Woese et al., 1980; Razin y Freundt, 1984; Weisburg et al., 1989; Razin, 1992; Nicolet, 1996). Adicionalmente, Neimark y colaboradores (2001) propusieron transferir algunos miembros de los géneros *Haemobartonella* y *Eperythrozoon* al género *Mycoplasma*.

Por otra parte, filogenéticamente los mollicutes han sido divididos en cinco grupos: *M. hominis*, *M. pneumoniae*, *Spiroplasma*, *Anaeroplasma* y *Asteroleplasma* (Weisburg et al., 1989; Peters et al., 2008; Brown et al., 2010F) (**Figura VIII-2**).

Evolutivamente, el género *Acholeplasma* parece ser el más antiguo, cuya formación implicó la pérdida de la pared celular y una marcada reducción genómica. Son muy difícilmente distinguibles de *Anaeroplasma*, debido a que su gen ARNr 16S es muy similar, sin embargo, la condición anaerobia de este último permite su distinción (Weisburg et al., 1989). La separación de los diferentes linajes de mollicutes a partir de *Acholeplasma* ha ido acompañada por alteraciones génicas traducidas en cambios estructurales (carácter helicoidal y motilidad en *Spiroplasma*) o bien, en posteriores reducciones genómicas más importantes, como en el caso de *Mycoplasma*.

El género *Mycoplasma* es el que sin duda posee el mayor número de especies reconocidas (117 especies y 14 especies candidatas a la caracterización oficial hasta el año 2010), muchas de ellas consideradas patógenas para humanos, ganado (bovino, caprino y porcino) o aves. Debido a la descripción de nuevas especies su número aumenta cada año, por ejemplo: *Mycoplasma haemolamae* (Crosse et al., 2012) y *M. neophronis* (Suárez-Pérez et al., 2012). Los microorganismos clasificados a nivel taxonómico dentro de este género se encuentran divididos en tres de los grupos filogenéticos: grupo hominis (con los clústeres *M. equigenitalium*, *M. bovis*, *M. lipophilum*, *M. synoviae*, *M. hominis*, *M. pulmonis*, *M. sualvi* y *M. neurolyticum*) y grupo pneumoniae (con los clústeres *M. fastidiosum*, hemotrópico, *M. pneumoniae*, *M. muris*, y *Ureaplasma*) (Johansson y Pettersson, 2002) y el grupo *Spiroplasma* (Brown et al., 2010F).

El número de especies de los restantes géneros de la Clase Mollicutes (*Ureaplasma*, *Entomoplasma*, *Mesoplasma*, *Spiroplasma*, *Acholeplasma*, “*Candidatus Phytoplasma*”, *Anaeroplasma* y *Asteroleplasma*) también está en constante crecimiento y es muy dinámico, bien por el descubrimiento de nuevas especies como por la reclasificación de otras ya descritas pero clasificadas erróneamente (Johansson et al., 1998; Neimark et al., 2001; Brown et al., 2010F).

Tabla VIII-2 : Descripción de la Clase *Mollicutes* (Brown et al., 2010F)

| Orden | Familia | Género | Especie ^a | Tamaño del genoma (kpb) | Exigencia de colesterol | Hábitat ^b | Característica |
|-------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|----------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------|--|
| I. <i>Mycoplasmatales</i> | <i>Mycoplasmataceae</i> | <i>Mycoplasma</i> | 116, 9, 1, 4 | 580-1.350 | + | H, A | - |
| I. <i>Mycoplasmatales</i> | <i>Mycoplasmataceae</i> | <i>Ureaplasma</i> | 7, 0, 0, 0 | 760-1.140 | + | H, A | Hidrólisis de urea |
| I. <i>Mycoplasmatales</i> | <i>Incertae sedis</i> | <i>Eperythrozoon</i> | 4, 0, 0, 0 | sd ^c | sd | A | Hemotrópico |
| I. <i>Mycoplasmatales</i> | <i>Incertae sedis</i> | <i>Haemobartella</i> | 1, 0, 0, 0 | sd | sd | A | Hemotrópico |
| II. <i>Entomoplasmatales</i> | <i>Entomoplasmataceae</i> | <i>Entomoplasma</i> | 6, 0, 0, 0 | 870-900 | + | N, P | - |
| II. <i>Entomoplasmatales</i> | <i>Entomoplasmataceae</i> | <i>Mesoplasma</i> | 11, 0, 0, 0 | 825-930 | - | N, P | Crecimiento con PES ^d |
| II. <i>Entomoplasmatales</i> | <i>Spiroplasmataceae</i> | <i>Spiroplasma</i> | 37, 0, 0, 0 | 780-2.220 | + | N, P | Forma helicoidal |
| III. <i>Acholeplasmatales</i> | <i>Acholeplasmataceae</i> | <i>Acholeplasma</i> | 18, 0, 0, 0 | 1.500-1.650 | - | A, N, P | - |
| III. <i>Acholeplasmatales</i> | <i>Incertae sedis</i> | " <i>Candidatus Phytoplasma</i> " | 0, 27, 0, 0 | 530-1.350 | sd | N, P | No ha sido posible cultivarlos <i>in vitro</i> |
| IV. <i>Anaeroplasmatales</i> | <i>Anaeroplasmataceae</i> | <i>Anaeroplasma</i> | 4, 0, 0, 0 | 1.500-1.600 | + | A | Anaeróbico estricto |
| IV. <i>Anaeroplasmatales</i> | <i>Anaeroplasmataceae</i> | <i>Asteroleplasma</i> | 1, 0, 0, 0 | 1.500 | - | A | Anaeróbico estricto |

^a Número de especies: válidas, *Candidatus*, *Incertae sedis*, inválidas.

^b H: Humano; A: Animales vertebrados; N: Animales invertebrados; P: Plantas.

^c sd: Sin determinar.

^d PES: Polioxietileno de sorbitán.

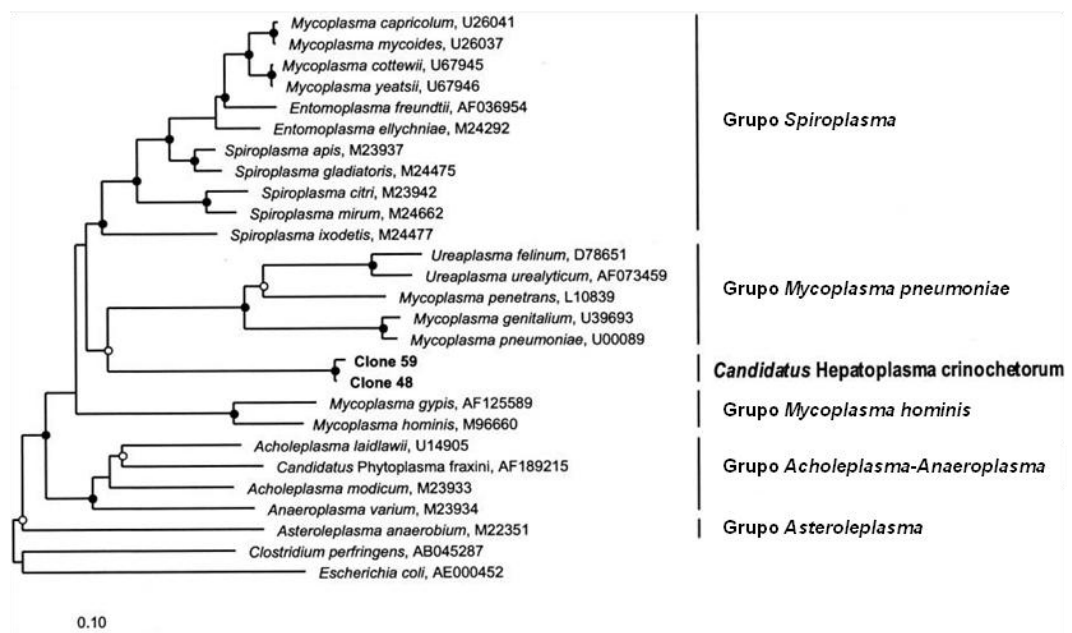


Figura VIII-2: Agrupación filogenética de la Clase Mollicutes (Wang et al., 2004B)

Finalmente, se ha propuesto el género **Hepatoplasma** (*Mollicutes*, *Mycoplasmatales*) a partir de “*Candidatus Hepatoplasma crinochetorum*” un simbiote encontrado en ocho especies de isópodos terrestres (Wang et al., 2004B; Fraune y Zimmer, 2008; Leclercq et al., 2014).

1.3.1.3 Características ultraestructurales

Los mollicutes poseen solamente aquellos orgánulos y rutas metabólicas indispensables para su crecimiento y replicación. Así, su estructura se reduce a una membrana citoplasmática, una molécula bicatenaria circular de ácido desoxirribonucleico

(ADN), moléculas de ácido ribonucleico (ARN), ribosomas y gránulos citoplasmáticos (Figura VIII-3).

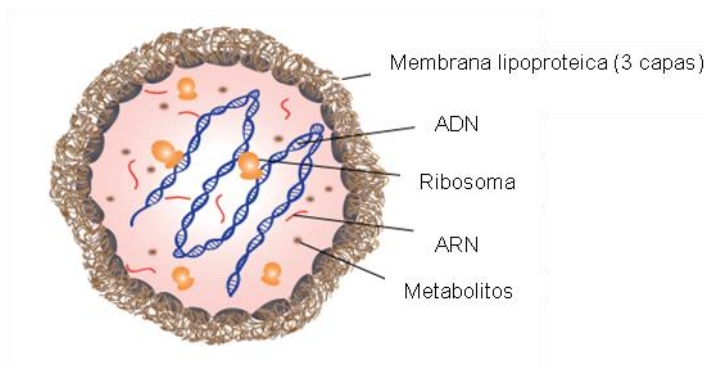


Figura VIII-3: Esquema de la estructura celular de un mollicutes. (<http://www.invivogen.com>)

No presentan orgánulos subcelulares organizados, como mitocondrias, ni tampoco membranas intracitoplasmáticas. La membrana citoplasmática es la única separación entre el citoplasma y el medio, siendo estructuralmente muy similar a las membranas celulares eucariotas. Corresponde a una estructura trilaminar compuesta por dos tercios de proteínas y un tercio de lípidos, principalmente fosfolípidos y glucolípidos, que junto con las primeras constituyen los determinantes antigénicos más importantes. Como no poseen pared celular, necesitan vivir en un entorno de elevada presión osmótica para equilibrar así su propia presión osmótica interna (Poveda et al., 2002).

I.3.1.3.1 Estructura celular y cápsula

A través de microscopía electrónica ha sido posible identificar algunas de las principales estructuras celulares de los mollicutes: su membrana celular de estructura bilaminar y el citoplasma, donde se pueden diferenciar los ribosomas y el material nucleico. Adicionalmente, el uso de esta técnica junto con la tinción de rojo rutenio, que tiñe específicamente mucopolisacáridos ha mostrado la presencia de una matriz

extracelular fibrilar o “cápsula” que presenta una estrecha relación con la membrana celular (Wilson y Collier, 1976; Minion y Rosenbusch, 1993). Esta cápsula ha sido observada en varias especies de los géneros **Mycoplasma** (por ejemplo: *M. gallisepticum*, *M. hominis*, *M. hyopneumoniae*, *M. meleagridis*, *M. pneumoniae* y *M. synoviae*, entre otras) y **Ureaplasma** (*U. urealyticum*) (Boatman y Kenny, 1971; Robertson y Smook, 1976; Rurangirwa et al., 1987). Su función no es totalmente clara (Minion y Rosenbusch, 1993), aunque se cree que puede desempeñar un rol en su patogenicidad, favoreciendo la adhesión de estas bacterias al tejido del hospedador (Robb, 1984), incrementando su toxicidad y/o eludiendo la respuesta inmune celular al dificultar o inhibir los procesos de fagocitosis (Rosenbusch y Minion, 1992, Marshall et al., 1995).

I.3.1.3.2 Membrana celular y estructura antigénica

Al igual que en otras células, la membrana celular de los mollicutes es una membrana permeable selectiva flexible y trilaminar que rodea el citoplasma. Está formada por una bicapa de fosfolípidos, por proteínas de membrana insertadas en ella y una pequeña porción de carbohidratos complejos en forma de glicoproteínas y glicolípidos (Kahane y Tully, 1976; Rottem y Kahane, 1993). La porción lipídica constituye un tercio de su composición y las proteínas, los otros dos restantes (Razin et al., 1998). A diferencia de las bacterias gram-negativas, en los mollicutes las proteínas se encuentran ancladas exclusivamente a la parte externa de la membrana y no en diferentes localizaciones dependiendo de su función. Una forma característica en que se encuentran dichas proteínas es como lipoproteínas que, al igual que los lipopolisacáridos en bacterias gram-negativas, pueden modificar su secuencia e incrementar así la variabilidad antigénica de la bacteria, así como jugar un papel importante en la modulación de la respuesta inmune del hospedador (Chambaud et al., 1999). A pesar de que existe una gran variedad de proteínas de membrana sólo han sido descritas cuatro funciones: proteínas de transporte ABC, lipoproteínas con función estructural y proteínas

con funciones enzimáticas o capacidad de adherencia (Hayashi y Wu, 1990; Sutcliffe y Russell, 1995).

A modo de ejemplo puede observarse el caso de *M. gallisepticum* y *M. synoviae* que a pesar de tener un pequeño genoma, como todos los mollicutes, son capaces de producir variaciones de antígenos de superficie, así como de invadir células. Estas propiedades les ayudarían a evitar los mecanismos de defensa del hospedador, permitiéndoles persistir durante largos períodos y superar una aparentemente buena respuesta inmune. La localización intracelular también podría explicar la razón de los que los tratamientos con antibióticos no eliminan necesariamente la infección (Bradbury y Kleven, 2008).

I.3.2 TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MOLLICUTES

I.3.2.1 Procedimientos preliminares (Tully y Whitcomb, 1995; Ramírez, 1999)

I.3.2.1.1 Cultivo puro

Antes de realizar un estudio bioquímico es esencial tener los mollicutes en cultivos puros. El procedimiento recomendado consiste en sembrar en medio sólido diluciones del cultivo, previamente filtrado (0,22 – 0,45 μm) y clonar las colonias que crecen en forma aislada, colocarlas en medio de cultivo líquido y repetir el mismo procedimiento. Es recomendable clonar al menos tres veces. La clonación se realiza para garantizar que se trabaja sólo con una especie.

I.3.2.1.2 Ausencia de pared celular

La ausencia de pared celular es fácilmente observable con microscopía electrónica.

I.3.2.1.3 Detección de formas L bacterianas

Existen bacterias que al estar expuestas a ciertos inhibidores pueden perder su pared celular, y son denominadas “formas L”. Para garantizar la pureza del cultivo, éste se inocula en un medio de cultivo general líquido y sólido, ambos sin antibióticos, con el objetivo de verificar así el crecimiento o no de potenciales bacterias distintas a mollicutes.

I.3.2.1.4 Morfología de las colonias

En un cultivo en medio sólido la mayoría de las colonias de mollicutes presentan una típica forma de “huevo frito”, con una zona central opaca de crecimiento profundo en el agar debida, probablemente, a una ligera actividad proteolítica; y la zona periférica translúcida del crecimiento superficial. El género *Ureaplasma* presenta, generalmente, colonias sin una zona periférica, mostrándose totalmente oscura en presencia de medios con cloruro de calcio o de manganeso. Adicionalmente, se ha observado que cuando las condiciones de cultivo no son óptimas algunas especies pueden producir colonias sin zona periférica o sin zona central (Taylor-Robinson, 1989).

El tamaño de las colonias puede variar entre 15 µm y 2 mm, y está determinado genéticamente, pudiendo ser incluso heterogéneo dentro de la misma especie. Los mollicutes que presentan un crecimiento más rápido en medio sólido son aquellos que producen colonias mayores, debido a que contienen más células que aquellas especies de colonias pequeñas. Otros factores que pueden influir en su tamaño y forma son: la composición e hidratación de los medios utilizados, las condiciones atmosféricas, la

densidad de cultivo y su edad; observándose, por ejemplo, un gran número de pequeñas colonias cuando se utiliza una alta concentración de siembra.

1.3.2.1.5 Requerimientos de esteroides

El requerimiento de esteroides puede ser utilizado para separar grupos taxonómicos muy próximos. El orden *Mycoplasmatales* y los géneros *Entomoplasma* y *Anaeroplasma* son dependientes de esteroides, por el contrario, el orden *Acholeplasmatales* y los géneros *Mesoplasma* y *Asteroleplasma*, no. El procedimiento más simple consiste en comprobar directamente si la especie crece en un medio carente de esteroides, pudiendo, incluso, cuantificar sus requerimientos usando medios con diferentes concentraciones de colesterol (Tully, 1983).

Un método indirecto para determinar dicho requerimiento consiste en sembrar una placa de medio sólido y depositar en su superficie discos inertes de papel de filtro impregnados con una solución alcohólica de digitonina (1,5% p/v) o de polianetol sulfato de sodio (5, 10, 20% p/v). Ambos compuestos consiguen ocupar el lugar de los esteroides dentro de la membrana de aquellos micoplasmas que los requieren, impidiéndoles su uso y provocando la destrucción de su membrana. La sensibilidad a la sustancia es clara al aparecer un halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco impregnado (radio mayor de 5 mm). Se cuida que el medio sólido para esta prueba esté suplementado con 20% de suero de caballo, evitando así falsos resultados positivos debidos al pobre crecimiento que presenta naturalmente el género *Acholeplasma* en medios de cultivo con bajo porcentaje de suero (Freundt et al., 1973).

1.3.2.2 Métodos bioquímicos y enzimáticos

Debido a la simplicidad metabólica de los mollicutes, el número de técnicas disponibles para detectar sus actividades enzimáticas específicas y sus requerimientos nutricionales es relativamente pequeño. Aún así, los métodos de identificación

bioquímicos y enzimáticos son importantes en la diferenciación taxonómica básica y a nivel de familia y género (Poveda y Nicholas, 1998). No obstante, estas técnicas no son cuantitativas y a veces su interpretación puede ser confusa, sobre todo cuando hay bajas cantidades de células o cuando son utilizados medios complejos con muchos sustratos alternativos (Miles y Agbanyim, 1998).

I.3.2.2.1 Hidrólisis de la urea

Una técnica bastante sencilla consiste en la observación de la alcalinización de un medio de cultivo suplementado con 1% de urea. Hay que notar que hay especies del género *Mycoplasma* que hidrolizan la arginina, y que sin poseer actividad ureásica, pueden provocar igualmente la alcalinización del medio al metabolizar las pequeñas cantidades de tal aminoácido que tienen los medios de cultivo convencionales. Por esta razón, Razin (1983) recomienda usar métodos más específicos para detectar dicha actividad.

Shepard y Howard (1970) desarrollaron una técnica que detecta la actividad ureásica directamente en las colonias. Está basada en observar la formación del dióxido de manganeso (MnO_2) a partir de cloruro de manganeso, debido al amoníaco liberado durante la hidrólisis de la urea. El MnO_2 es insoluble en agua por lo que precipita alrededor y en las colonias, apreciándose una coloración marrón.

Por otra parte, el *Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes* (1979) recomendó la utilización de cultivos líquidos con urea marcada con Carbono 14, mediante el seguimiento de su desaparición (Masover et al., 1977).

I.3.2.2.2 Hidrólisis de azúcares

Los mollicutes pueden dividirse en fermentativos y no fermentativos de acuerdo a su habilidad para metabolizar azúcares, más específicamente la glucosa. La

comprobación de su metabolismo es una prueba obligatoria en su caracterización (Razin y Cirillo, 1983). Las especies fermentadoras de carbohidratos catabolizan la glucosa u otros carbohidratos mediante la vía glicolítica, mayoritariamente hasta ácido láctico y algunos hasta ácido pirúvico, ácido acético y acetilmetilcarbinol (Taylor-Robinson, 1989).

Miles y Lee (1983) recomiendan la utilización de medios que no contengan suero con tiempos de incubación largos (14-21 días), debido a que éste contiene naturalmente enzimas sacarolíticas que no pueden ser destruidas ni siquiera con calor. Sin embargo, no presenta ningún problema con especies fermentativas rápidas.

La utilización de la glucosa puede ser demostrada de diferentes maneras: mediante el descenso de pH del medio, midiendo la glucosa utilizada, detectando la producción de metabolitos de la glucosa, mediante la reacción de la glucosa-oxidasa o comprobando la presencia de la hexoquinasa (enzima básica de la glicólisis).

Aluotto y colaboradores (1970) describieron cómo determinar el metabolismo de la glucosa a través del descenso del pH del medio. El método consiste en añadir 1% de glucosa al cultivo líquido y un indicador de pH (rojo fenol al 0,005%) a un pH de 7,6. El descenso de pH se observa a través del cambio de color (de rojo a amarillo) y es comparado con una batería de tubos ajustados a diferentes pH's y teniendo como referencia un tubo testigo. Una reacción positiva la constituye un descenso del pH de 0,5 unidades. Cuando se utilizan especies de lento crecimiento puede descender el pH debido a otros factores y no a la propia fermentación de glucosa, resultando en un resultado falso-positivo. Esto se debe a que los medios tienen entre sus componentes suero equino y extracto de levadura que con el tiempo pueden descomponerse y acidificar el medio. Para evitar este problema se utilizan medios sin extracto de levadura y con un 1% de fracción sérica bovina, en sustitución al suero equino (Razin y Cirillo, 1983). También es aconsejable preparar el medio base con la enzima arginina descarboxilasa para eliminar las trazas de arginina (Freundt et al., 1979).

Otra forma de detectar la fermentación de la glucosa es a través de la determinación de metabolitos ácidos. Entre los ácidos producidos en el curso de la reacción se encuentran el láctico, pirúvico y el acético (Tourtellote y Jacobs, 1960). La presencia de dichos ácidos puede demostrarse utilizando glucosa radioactiva, identificando posteriormente los ácidos marcados mediante una columna de intercambio iónico tratada con cloruro de litio (Cirillo y Razin, 1973). En el caso negativo toda la radioactividad se encontrará en la fracción de glucosa no utilizada.

Otro método consiste en la determinación de la desaparición de la glucosa por la reacción de la glucosa-oxidasa (Edward y Moore, 1975). La enzima oxida el azúcar con la consiguiente formación de ácido glucurónico y peróxido de hidrógeno. Este último da lugar, por la acción de la peroxidasa, a radicales que a su vez reaccionan con un compuesto cromógeno (ortofenildiamina). El resultado de la reacción es un compuesto coloreado, fácilmente detectable por espectrofotometría (Huggett y Nixon, 1957). Es necesario tener una gran suspensión celular de al menos 10^9 UFC/ml. Se realizan dos determinaciones, una de un medio de cultivo glucosado sin inocular y otra de un medio de cultivo glucosado e inoculado con el microorganismo problema e incubado 48 h a 37°C. La prueba se considera positiva si existe una diferencia apreciable entre ambas absorbancias (niveles de glucosa).

Por último, Cirillo y Razin (1973) introdujeron la técnica de la determinación de la actividad de la hexoquinasa, basada en que los organismos fermentativos poseen esta enzima con la que fosforilan la glucosa. Se parte de una suspensión celular de concentración conocida, se desintegra por criolisis y se le adiciona glucosa marcada con carbono 14. Posteriormente es incubada y centrifugada, y el sobrenadante transferido a una columna (cloruro de litio) de intercambio iónico, que absorberá la glucosa fosforilada. Finalmente, se desprende de la columna y se cuantifica mediante un contador de centelleo.

I.3.2.2.3 Hidrólisis de la arginina

Esta capacidad hidrolítica la poseen algunas especies del género *Mycoplasma*, ya fermenten o no la glucosa. La hidrólisis de la arginina se produce por la acción de tres enzimas: arginina-deiminasa, ornitina-transcarbamilasa y carbamato-quinasa, hasta producir amoníaco, CO₂ y ATP (Barile, 1983).

Schimke y colaboradores (1966) describieron un método sencillo y práctico para comprobar esta acción hidrolítica. Está basado en la detección del amoníaco a través de la alcalinización del medio de cultivo. Para evitar que algunos tubos inoculados puedan mostrar un incremento de pH debido a efectos inespecíficos deben emplearse concentraciones muy bajas de suero de caballo, o incluso reemplazarlo con la fracción sérica bovina. De esta forma también se evita el excesivo efecto tampón que genera una gran cantidad de suero (Barile, 1983).

Pese a lo anterior, el procedimiento preferido y recomendado para investigar la hidrólisis de la arginina es la determinación de la actividad arginina-deiminasa, basada en la formación de citrulina. Es empleado un medio de cultivo líquido, con pH 6,5, suplementado con arginina el cual muestra un color amarillo-naranja cuando se forma citrulina. Posteriormente, el cambio es medido por espectrofotometría a una absorbancia máxima de 490nm (Archibald, 1944; Poveda, 1988).

El sistema enzimático comentado ha sido estudiado en varias especies de bacterias (Cohen y Brown, 1960), y usado también para la caracterización de los mollicutes, iniciándose con las investigaciones de Smith (1955) sobre micoplasmas uretrales humanos. Posteriormente, Schimke y Barile (1963), Barile y Schimke (1963) y Barile y colaboradores (1966) llegaron a categorizar las especies del género *Mycoplasma*, como arginina positivos y arginina negativos, clasificación que en la actualidad tiene una importante vigencia (Barile, 1983).

I.3.2.2.4 Actividad de la fosfatasa

La actividad fosfatásica está presente en aproximadamente un tercio de las especies conocidas del género *Mycoplasma* y puede ser observada a través de procedimientos relativamente simples. Es utilizada en conjunto con otras pruebas bioquímicas en la investigación preliminar de una especie desconocida, permitiendo reducir el número de pruebas serológicas necesarias para establecer su identidad. Sin embargo, esta prueba no tiene valor práctico en la investigación de las especies del género *Acholeplasma*, exceptuando a *A. laidlawii* que posee esta propiedad de manera muy limitada (Williams y Wittler, 1971); ni en cepas del género *Ureaplasma* todas las cuales son positivas a esta prueba (Black, 1973).

Por otra parte, la actividad de la fosfata también puede ser determinado a través del método basado en la acción que tiene la fosfatasa producida por los microorganismos sobre el difosfato de fenolftaleína del medio de cultivo sólido (Aluotto et al., 1970). Por la acción hidrolítica de la enzima, se libera la fenolftaleína, siendo fácilmente detectable por la aparición de un color rojo-violeta en presencia de álcalis (pH entre 9 y 10) después de siete días de incubación (Freundt et al., 1979). La hidrólisis del difosfato de fenolftaleína puede ser determinada tanto en medio líquido como en sólido.

Para evitar resultados falso-positivos y/o dudosos es aconsejable calentar el suero de caballo y el extracto de levadura (1 h a 60 °C) con el fin de inactivar su posible actividad fosfatásica (Bradbury, 1983).

I.3.2.2.5 Reducción del Tetrazolium

La habilidad de reducir el 2,3,5-trifenil-tetrazolium, dando una coloración rojiza al medio, es una característica de numerosas especies del género *Mycoplasma*, y de un gran valor en la identificación presuntiva de *M. pneumoniae* en los procesos clínicos

humanos, ayudando también en la identificación al elegir los antisueros que deben ser utilizados en su tipificación serológica.

La técnica de Erno y Stipkovits (1973), demostró la actividad reductora, agregando al medio líquido el *2,3,5-trifenil-tetrazolium* a una concentración de 0,2%. La inoculación de los tubos con el organismo objeto de estudio se hace por duplicado, incubándose uno en aerobiosis y el otro en anaerobiosis durante dos semanas. La reacción se considera positiva si aparece un precipitado rojizo en alguno de los tubos. La densidad de cultivo utilizada puede influir en los resultados obtenidos (Senterfit, 1983).

Aluotto y colaboradores (1970) bien como Woods y Smith (1972) adaptaron este método para utilizarlo en cultivos hechos en medio sólido, siendo así más rápido e independiente de la densidad de cultivo y de la cantidad de inóculo. Después de tres o cuatro horas de incubación puede observarse el color rosa inicial que virará a rojo púrpura.

I.3.2.2.6 Formación de películas y cristales

Hay mollicutes que después de unos días creciendo en medio sólido desarrollan una película característica y cristales alrededor de las colonias. La película está formada por colesterol y fosfolípidos, mientras que los cristales se atribuyen a depósitos de sales de calcio y magnesio procedentes de los ácidos grasos que son liberados por la actividad lipolítica de estos microorganismos. La intensidad de ambas reacciones depende del organismo en cuestión y de la composición del medio de cultivo (Freundt, 1983). Este fenómeno fue descrito por primera vez por Edward en 1950, empleando un medio que contenía un 20% de suero de caballo, observación corroborada más tarde por (Fabricant y Freundt, 1967), quienes obtuvieron también un gran número de reacciones positivas en medios enriquecidos con suero de cerdo y emulsión de yema de huevo al 10%.

Si se trabaja con medios que contienen suero de caballo y emulsión de yema de huevo, existe también la posibilidad de detectar si se produce actividad proteolítica. En caso positivo, aparecerán unas zonas adyacentes al área de crecimiento de las colonias. Este fenómeno es muchas veces transitorio y puede estar o no asociado con la producción de películas y cristales (Freundt, 1983). Es necesario señalar que este fenómeno carece de valor diagnóstico significativo, pero es interesante notar que algunos mollicutes no producen tales reacciones bajo las condiciones de prueba.

1.3.2.3 Perfiles de proteínas totales

El conjunto de proteínas celulares es extraído y sometido a electroforesis, unidimensional o bidimensional en un gel de poliacrilamida que contiene también el agente desnaturizante dodecilsulfato sódico (SDS). De esta forma se obtienen perfiles característicos que sirven para el agrupamiento de las cepas objeto de estudio (Kerstens et al., 1994)

1.3.2.4 Métodos serológicos

1.3.2.4.1 Inhibición de crecimiento

Es realizada en un medio sólido y está basada en una reacción antígeno-anticuerpo específica en la que se produce la lisis del microorganismo sin mediación del complemento. La capacidad del antisuero de inhibir el crecimiento del microorganismo se observa por medio de un halo de inhibición superior a 2 mm alrededor de un disco inerte impregnado con él (Poveda y Nicholas, 1998).

1.3.2.4.2 Inhibición del metabolismo

Corresponde a un procedimiento alternativo a la inhibición de crecimiento, realizado en medio líquido y especialmente útil para organismos aislados que no crecen

bien en medio sólido. Está basado en los cambios de pH que se originan cuando son metabolizados los sustratos usados como fuentes de nutrientes en los medios de cultivo. Adicionalmente, son complementados con indicadores que cambian de color de acuerdo al pH del medio. La correspondencia antígeno-anticuerpo produce la lisis de los microorganismos que no utilizan el sustrato en cuestión, previniendo así el cambio de color del medio (Poveda y Nicholas, 1998).

1.3.2.5 Inmunofluorescencia

Los procedimientos de inmunofluorescencia en la identificación de mollicutes fueron introducidos por Del Giudice et al. (1967). Una de sus principales aplicaciones es la tipificación serológica de los microorganismos obtenidos directamente en un primer aislamiento. La gran ventaja es que pueden ser detectadas e identificadas especies que pueden estar mezcladas con otras. Otras ventajas adicionales son: que excluyen la necesidad de utilizar cultivos puros; la relativa facilidad con que un número de micoplasmas puede ser identificado secuencialmente en la muestra a investigar; la posibilidad de detectar microorganismos que están presentes minoritariamente en una muestra; y que aseguran la pureza de los cultivos mediante clonajes sucesivos (Gardella et al., 1983).

Estas técnicas, directas o indirectas, están basadas en el marcaje de las inmunoglobulinas específicas presentes en los antisueros usando un fluorocromo del tipo del isotiocianato de fluoresceína. El proceso de marcaje o de conjugación suele ser complicado puesto que exige no sólo el fraccionamiento proteico mediante sales neutras u otros sistemas para la extracción de los anticuerpos del suero, sino también una posterior diálisis y la conjugación propiamente tal con el fluorocromo en cuestión (Poveda, 1988).

En los procedimientos directos se adiciona una pequeña cantidad de inmunoglobulinas marcadas sobre bloques de agar que contienen las colonias en

estudio. Posteriormente, son incubados y se realizan varios lavados con tampón PBS. Son depositados en un portaobjetos y observados en un microscopio de epifluorescencia, utilizando un objetivo débil para la localización de colonias y luego un objetivo apocromático de 40x (Freundt et al., 1979).

El método directo es similar al indirecto, aunque este último dispone de un tercer elemento: un suero antiglobulinas de la especie, conjugado con el fluorocromo. Se considera que este método es más sensible y específico que los directos (Rosendal y Black, 1972).

1.3.2.6 Inmunohistoquímica

Este tipo de prueba permite la determinación de la localización de los microorganismos en los tejidos afectados a través del uso de anticuerpos monoclonales y policlonales (Rodríguez et al., 1998).

1.3.2.7 Métodos de biología molecular

1.3.2.7.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa – PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction – PCR*) es una técnica de biología molecular cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular partiendo de un mínimo. Esta técnica consiste en utilizar pequeñas secuencias de ADN (cebadores o *primers*) que limitan áreas del genoma a ser copiadas y se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse las polimerasas para que vuelvan a duplicarlas (Bartlett y Stirling, 2003). Las fases de una PCR son: Fase de **inicio** (*Initialization step*) para activar la enzima; **desnaturalización** (*denaturation*) al separarse las doble cadenas

de ADN; **alineamiento** (*annealing*) cuando se unen los cebadores a la cadena de ADN; **extensión** o elongación de la cadena (*extension/elongation*) cuando son realizadas copias del fragmento de ADN deseado; y la fase de **elongación final** (*final elongation*) en la que se completan todas las copias inconclusas (Biau, 1997).

I.3.2.7.2 Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuyo objetivo es la determinación del orden de los nucleótidos (Adenina, Citosina, Guanina y Tirosina) en un oligonucleótido de ADN. El desarrollo de esta técnica ha acelerado significativamente la investigación y permitido importantes descubrimientos biológicos en diversas áreas como taxonomía, filogenia, estudios poblaciones, heredabilidad de caracteres, etc. Fue desarrollada en la década de los '70 y con el tiempo sufrió un gran desarrollo, pasando de ser una técnica manual y lenta a ser una totalmente automatizada, con secuenciadores automáticos que pueden analizar gran número de muestras en poco tiempo, permitiendo incluso la secuenciación de genomas completos de microorganismos, plantas y animales (Prescott et al., 2004; Hall, 2007). Actualmente, existen bases de datos *vía online* que alojan todas las secuencias genómicas que han sido determinadas en estudios de genética, siendo abiertas y accesibles para cualquier investigador. Todas ellas están integradas en la *International Nucleotide Sequence Database Collaboration* donde se encuentran: *DNA DataBank of Japan* - DDBJ de Japón; el *European Molecular Biology Laboratory* – EMBL (Europa); y el GenBank del *National Institutes of Health* – NIH (U.S.A.). Esta última está disponible junto con la base de datos RefSeq en la página del *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>).

La secuenciación de productos de PCR ha sido aplicada a la caracterización y clasificación filogenética de los organismos, entre ellos, los mollicutes (Hopert et al., 1993; Uphoff y Drexler, 2002; McAuliffe et al., 2003). La secuencia más utilizada es la del gen ARNr 16S (*gen que codifica el ARN ribosómico*) que se ha mostrado como una

excelente herramienta taxonómica en bacterias y a través de la cual se han redefinido las relaciones filogenéticas que con anterioridad eran dependientes de pruebas relacionadas con metabolismo celular. La explicación es que tal secuencia abarca regiones altamente conservativas y otras muy variables que pueden usarse para diferenciar géneros y especies (Göbel et al., 1987; Rodicio y Mendoza, 2004). El estudio de este gen ha llevado a la detección e identificación de varias especies de bacterias (Deng et al., 1992).

En el caso particular de procariontes, el *loci* del ADNr contiene los genes que codifican los tres tipos de subunidades estructurales de sus ribosomas: 16S, 23S y 5S. Estos genes están separados entre sí por regiones de distinto tamaño y secuencia dependiendo del género y especie de la bacteria. Dentro de ellas, la región intergénica (*Intergenic Spacer Region - ISR*) entre los genes ARNr 16S y 23S es la más variable y últimamente ha sido utilizada para establecer relaciones filogenéticas entre microorganismos muy próximos, presentando la ventaja de que al encontrarse entre genes altamente conservados es posible amplificarla en prácticamente cualquier microorganismo utilizando cebadores universales (Rodicio y Mendoza, 2004). La ISR ha sido utilizada para identificar especies de mollicutes que poseen el gen ARNr 16S muy similar (Ej. *M. auris* vs *M. alkalescens*: 98,8% de similitud) (Harasawa, 1996; Tang et al., 2000; Volokhov et al., 2006; Ramírez et al., 2011; Rebelo et al., 2011). Sin embargo, existen especies de mollicutes que tienen un alto grado de similitud como es el caso de *M. canadense* y *M. arginini* que poseen porcentajes de similitud entre ellos de 99% y 96,9% para el gen ARNr 16S y la ISR, respectivamente; por lo que se ha conseguido diferenciar ciertas especies basándose en el ARNr 23S (Hotzel et al., 2003; Ramírez et al., 2008B; 2012). Actualmente, se intenta discernir si la comparación entre diferentes especies de la región comprendida entre los genes ARNr 23S y 5S podría aportar información de utilidad en la comparación entre especies (Ramírez et al., 2010).

I.3.2.7.3 PCR a tiempo real

De manera adicional, se ha trabajado en la creación y adaptación de protocolos de PCR a tiempo real (*real-time PCR*), debido a que es una técnica más sensible y específica que la PCR convencional, y al mismo tiempo puede dar información cuantitativa del ADN replicado (Baczynska et al., 2004; Dubosson et al., 2004; Rebelo et al., 2011). Básicamente, la técnica consiste en el uso de un fluorocromo (ej. SYBR Green) o sonda marcada con un fluoróforo que aumenta su emisión cada vez que se acopla a uno o más productos específicos de ADN replicados, permitiendo medir su tasa de generación y tener resultados cuantitativos (Stirling, 2003).

I.3.2.7.4 DGGE

Otro avance que es necesario destacar es la estandarización de la Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis – DGGE*), una técnica de trazado molecular consistente en la separación de las cadenas complementarias de ADN bicatenario dependiendo de su punto de desnaturalización (McAuliffe et al., 2003; 2005). Fue desarrollada en un principio para detectar mutaciones puntuales en las secuencias de ADN (Fischer y Lerman, 1983; Lerman y Beldjord, 1999), y después modificada y aplicada al análisis de poblaciones bacterianas, a través del análisis de los perfiles de fragmentos amplificados de sus genes ribosómicos (Muyzer et al., 1993). Esta técnica está basada en que un fragmento de ADN de doble cadena puede ser desnaturalizado por medios físicos (temperatura) o químicos (urea o formamida). Tal punto de desnaturalización aumentará con el tamaño y composición de la secuencia de nucleótidos que la conforman, aumentando con altos contenidos de guanina (G) y citosina (C). Cuando un fragmento de ADN se desnaturaliza su migración en un gel de electroforesis se detiene o se vuelve más lenta. En forma práctica, se utiliza un gel con gradiente de desnaturalización durante la migración de los fragmentos. Mediante esta técnica es posible convertir estados iniciales de ADN de doble cadena en estados de cadena sencilla desnaturalizada en algún punto de la migración para fragmentos de tamaño y secuencia específicos (Lerman y Beldjord, 1999).

McAuliffe y colaboradores (2003 y 2005) aplicaron esta técnica en la diferenciación de 67 especies de mollicutes y demostraron su utilidad y grado de especificidad, consiguiendo incluso diferenciar especies cuyo porcentaje de similitud basado en el gen ARNr 16S era de 98 % (Jensen et al., 2003). Esta técnica permitió la identificación y diferenciación de mollicutes aviares encontrados en especies silvestres muestreadas en la isla de Gran Canaria, permitiendo la discriminación de las diferentes especies a través de esta técnica. Debido a que cada especie presente daba como resultado una única banda en el gel de DGGE también fue posible conocer la presencia de más de una especie de mollicutes en las muestras, sin necesidad de cultivarlas o clonarlas (Suárez Pérez, 2012). Sin embargo, existen especies cuyo perfil de DGGE es idéntico como el caso de los micoplasmas aviares *M. columbinum* y *M. columbinasale* aislados en palomas, pero que mostraban una similitud de sólo 84% de la ISR. Otras especies con perfil similar son: *M. gatae* aislado en gatos y *M. phocicerebrale* aislado en mamíferos marinos; *M. maculosum* aislado en cánidos y *M. leopharyngis* aislado en leones; así como los micoplasmas caninos *M. canis* y *M. edwardii* (McAuliffe et al., 2005). Los análisis previos de la secuencia del gen ARNr y de la ISR en estas especies mostró que poseían un alto grado de similitud genómica (Pettersson et al., 2000; Chalker y Brownlie, 2004)

Actualmente, la DGGE es usada en conjunto con criterios fenotípicos para identificar organismos (identificación polifásica) (Stackebrandt et al., 2002).

1.3.2.7.5 Microarrays

El último avance en la detección e identificación de mollicutes es el desarrollo de chips de *microarrays* (Volkhov et al., 2006; Schnee et al., 2012). Esta técnica utiliza un chip en cuya superficie se muestra una colección de fragmentos de ADN (sondas específicas de los genes a estudiar). La muestra de ADN a ser analizada (molécula diana) es puesta sobre este chip y es leída su fluorescencia, observando así el nivel de

hibridación entre las sondas y la molécula diana; para finalmente, conocer el nivel de expresión de los genes utilizados (Schena et al., 1996).

1.3.2.7.6 Tipificación

La tipificación bacteriana corresponde al análisis de la variación genética o fenotípica de especies bacterianas con el objetivo de determinar marcadores específicos o datos que puedan servir para la caracterización y determinación de especies o subespecies, estudios de transmisión bacteriana, análisis epidemiológicos, etc. Esta técnica puede ser dividida en: **a)** Métodos basados en el análisis del tamaño de las bandas de ADN (obtenidas a través de digestión enzimática o PCR); **b)** métodos basados en el análisis directo de secuencias de ADN y **c)** aquellos que utilizan hibridación de sondas de oligonucleótidos marcadas (Rosales, 2014).

1.3.2.7.6.1 Métodos basados en el análisis del tamaño de las bandas de ADN

Estos métodos son los más utilizados ya que el análisis de bandas de ADN puede otorgar de manera sencilla un perfil único para cada especie, además de ser fáciles y baratos de realizar y reproducir.

1.3.2.7.6.1.1 Bandas obtenidas a través de digestión enzimática

En estos métodos se utilizan enzimas de restricción capaces de cortar fragmentos de ADN tras reconocer ciertas combinaciones específicas de nucleótidos, denominados sitios de restricción (Roberts, 2005). Son usadas en tres técnicas de tipificación:

- a) Electroforesis de gel de campo pulsado (*pulsed field gel electrophoresis* – PFGE): El microorganismo a tipificar es cultivado hasta alcanzar una alta concentración de ADN, momento en el que las células son recolectadas e**

incluidas en bloques de agarosa y sometidos a digestión con enzimas de restricción, con el objetivo de dividir el genoma de la especie en estudio. Posteriormente, todos estos fragmentos de ADN son sometidos a una electroforesis con cambios de voltaje o fase (electroforesis de campo pulsado) en un gel de agarosa, obteniendo así perfiles específicos de ADN (Goering, 2010). A modo de ejemplo pueden citarse un estudio que determinó que hay cepas de micoplasmas que pueden permanecer en un mismo individuo sin alterar su perfil PFGE a pesar de su gran variabilidad intraespecífica (Kokotovic et al., 2002).

- b) Análisis de polimorfismos de longitud en fragmentos amplificados de ADN (*amplified fragment length polymorphism* - AFLP):** En esta técnica el ADN primero es digerido con enzimas de restricción. Los fragmentos obtenidos son a continuación amplificados por PCR empleando cebadores específicos de las secuencias que interesan y, finalmente, detectados por secuenciación capilar u otros métodos de observación (Mueller y Wolfenbarger, 1999). Utilizando AFLP fue posible establecer que la epidemia de *M. gallisepticum* en pájaros cantores en EEUU había tenido un único origen, conocimiento que siete años después fue útil al analizar una segunda epidemia y comprobar que era producida por una cepa distinta (Cherry et al., 2006).
- c) Análisis de polimorfismos de longitud en fragmentos de restricción tras PCR (*polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism* PCR-RFLP):** Es similar a AFLP, aunque con un orden invertido, ya que en este caso primero se amplifica por PCR una secuencia específica del ADN, la cual posteriormente es sometida a digestión con enzimas de restricción (Griffiths et al., 2002). Esta técnica ha sido útil para distinguir cepas de *M. pneumoniae* al analizar el gen P1 (Cousin-Allery et al., 2000); y entre cepas africanas y australianas de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC empleando el gen *bgl* (Vilei y Frey, 2004).

1.3.2.7.6.1.2 Bandas obtenidas por PCR

Estos métodos son muy utilizados debido a la fiabilidad, gran disponibilidad y la reducción progresiva de los costes que presenta la técnica de PCR.

- a) Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (*random amplified polymorphic DNA* – RAPD o *arbitrarily primed PCR* - AP-PCR): Esta técnica está basada en el uso de un solo cebador relativamente pequeño (aproximadamente 10 nucleótidos) que es capaz de unirse al ADN en estudio. A través de una PCR con bajo rigor (baja temperatura de alineación) el ADN es amplificado y son obtenidos productos de PCR de diferentes tamaños cuyo perfil puede ser comparado con otros, determinando así la similitud entre las especies bacterianas estudiadas. Esta técnica permite la obtención de productos de PCR en forma sencilla, requiere poco equipamiento y no es necesario conocer previamente la secuencia de ADN de las especies a estudiar, aunque presenta muy baja reproducibilidad por lo que es utilizada como medio de caracterización rápida pero no como una herramienta de tipificación de referencia (Penner et al., 1993). A través de esta técnica fue posible demostrar que la presencia de una banda de 5000 pb de peso molecular en cepas de *M. hyopneumoniae* estaba asociada a la moderada o alta virulencia de la especie (Vicca et al., 2003).
- b) Análisis de repeticiones en tándem de número variable (*variable number tandem repeat* – VNTR o *multi-locus tandem repeat analysis* - MLVA): Esta técnica se basa en el análisis del tamaño de fragmentos de ADN de zonas repetitivas encontradas en el genoma y amplificados por PCR. Una vez amplificados son analizados a través de gel de agarosa, secuenciación capilar u otros métodos de observación. Es la técnica de tipificación más utilizada, debido a su facilidad, rapidez y capacidad de reproducibilidad, así como por no tener costes tan altos, teniendo como

desventaja la necesidad de conocer previamente la secuencia de ADN a ser amplificados (Lindstedt, 2005; Van Belkum, 2007). Se han creado bases de datos de los resultados obtenidos con esta técnica, lo que ha hecho que sea ampliamente utilizada como referencia (Allix-Béguec et al., 2008). A través de VNTR han sido caracterizados algunos micoplasmas como *M. genitalium* (Cazanave et al., 2012) y *M. pneumoniae* (Dégrange et al., 2008), entre otros.

1.3.2.7.6.2 Métodos basados en análisis directo de secuencias de ADN

1.3.2.7.6.2.1 Secuencias de genes sencillos

En este método se analiza solamente un gen, lo que presenta ciertas limitaciones si se emplea como único parámetro para la tipificación, pues la información que puede brindar la secuencia de un solo gen, puede enmascarar la variabilidad intraespecífica entre cepas bacterianas. Por el contrario, cuando se utiliza para clasificar y determinar especies puede ser útil, como es el caso del uso del gen ARNr 16S en el cual está basada la taxonomía de bacterias (Rosselló-Mora y Amann, 2001; Rodicio y Mendoza, 2004). Esta técnica permitió diferenciar cepas de *M. hyopneumoniae* a través del análisis del gen p146 (Mayor et al., 2007).

1.3.2.7.6.2.2 Tipificación multilocus de secuencias (Multilocus sequence typing - MLST)

Este método es el que actualmente está más desarrollado. Está basado en el análisis de variaciones puntuales de las secuencias de genes constitutivos o de mantenimiento (*housekeeping genes*), los que sufren una baja presión selectiva por lo que cualquier variación puede asociarse a cambios evolutivos (Maiden et al., 1998). Al igual que sucede con la técnica de VNTR, los resultados obtenidos por MLST se encuentran en bases de datos disponibles a todos los investigadores; esto unido a que la

técnica tiene una alta reproducibilidad hace que sea una herramienta muy utilizada hoy en día (Chan et al., 2001). Esta técnica fue utilizada en la diferenciación de cepas de *M. agalactiae* y *M. hyopneumoniae* (Mayor et al., 2008; McAuliffe et al., 2011).

1.3.2.7.6.3 Métodos basados en la hibridación de sondas de oligonucleótidos marcadas

Este tipo de métodos consiste en una digestión del ADN con enzimas de restricción y su posterior aplicación de la técnica de “Southern blotting” (Southern, 1975), una técnica que permite hibridar los fragmentos obtenidos con oligonucleótidos marcados con isótopos radioactivos, permitiendo de esta manera, la detección de los fragmentos específicos buscados (Griffiths et al., 2002). Ha sido utilizada en la tipificación de *M. agalactiae* y *M. bovis*, entre otras (Pilo et al., 2003; Miles et al., 2005).

1.3.3 HÁBITATS Y ENFERMEDADES

El genoma de los mollicutes es el menor de todos los organismos vivos con capacidad autorreplicante conocidos, por lo que son muy dependientes de su hospedador para cubrir sus requerimientos nutricionales (Fraser et al., 1995). La mayoría de estas bacterias son comensales o parásitos, encontrándose en una amplia gama de hospedadores: plantas, invertebrados y vertebrados. Algunas han sido incluso consideradas simbiotes, como es el caso de algunos mollicutes aislados en artrópodos (Hackett y Clark, 1989; Fraune y Zimmer, 2008). Por otra parte, hay especies que son patógenos importantes para humanos, animales, insectos o plantas, pudiendo llegar a causar infecciones crónicas (Brown et al., 2010F).

En general, las enfermedades causadas por mollicutes pueden clasificarse en: a) enfermedades en las que la septicemia es la característica principal, presentándose de

forma aguda con fiebre y llevando a la muerte en pocos días; b) enfermedades que implican una fase irreconocible pero septicémica, seguida de la inflamación de articulaciones y/o cavidades serosas; c) enfermedades locales en el tracto respiratorio o genital, glándula mamaria o en la conjuntiva (Rosendal, 1988). Sin embargo, usualmente las infecciones provocadas por mollicutes son leves y crónicas; siendo localizadas más comúnmente en el tracto respiratorio (provocando aerosaculitis, neumonía y sinusitis) y genitourinario (pudiendo provocar abortos, vaginitis, vesiculitis seminal e infertilidad), en las glándulas mamarias (cuadro de mamitis) y las articulaciones (artritis) de animales y humanos (Howard & Gourlay, 1978; Tully, 1985; Yoder, 1990, Citti y Blanchard, 2003)

En el caso de los representantes del género *Mycoplasma* éstos están ampliamente extendidos en la naturaleza como parásitos (primarios, oportunistas o secundarios) o comensales de mamíferos terrestres (incluidos los humanos) y acuáticos, reptiles, aves y peces. La cantidad de hospedadores conocidos supera actualmente los 120 (Razin, 1995; Brown et al., 2010). Sus determinantes de virulencia son complejos y sus propiedades biológicas lo diferencian de las restantes bacterias patógenas. Algunos micoplasmas pueden formar parte de la población microbiana en organismos sanos, por lo que su asociación con enfermedades puede complicar el diagnóstico. Son conocidas algunas especies que pueden causar enfermedades agudas o crónicas en múltiples localizaciones y con una amplia gama de complicaciones (Baseman y Tully, 1997).

En general, los micoplasmas patógenos muestran una alta especificidad del hospedador, debido, probablemente, a factores de colonización específicos para los cuales los hospedadores presentan receptores, como ocurre con *M. pneumoniae* y *M. hyopneumoniae*, en humanos y porcinos, respectivamente (Gourlay y Howard, 1982). Tal especificidad también puede deberse a la incapacidad del hospedador de reconocer y responder ante los micoplasmas. Algunas especies presentan una especificidad de hospedador absoluta, otros pueden colonizar diferentes tipos de hospedadores genéticamente próximos mientras que otros se encuentran en diferentes hospedadores sin producir ninguna enfermedad ni ser patógenos (Rosendal, 1988).

Las infecciones por micoplasmas normalmente son leves y de naturaleza crónica. Las tres localizaciones más comunes en los humanos y animales son el tracto respiratorio (neumonía, aerosaculitis y sinusitis), el digestivo, el genitourinario (abortos, vaginitis, vesiculitis seminal, infertilidad), las glándulas mamarias (mamitis) y las articulaciones (artritis) (Weisburg et al., 1989; Yoder, 1990; Razin et al., 1998; Brown et al., 2010I). Las enfermedades producidas por micoplasmas son de carácter multifactorial, desarrollándose si están presentes otros factores como infecciones recurrentes, hacinamiento de animales y personas, condiciones climáticas inadecuadas, edad, constitución genética y/o estrés, entre otros (Rosendal, 1988; DaMassa et al., 1992). Adicionalmente, estas bacterias pueden actuar como inmunodepresores permitiendo la entrada y desarrollo de otras enfermedades (Weisburg et al., 1989; Neimark et al., 2001). Al igual que los micoplasmas, los representantes del género ***Ureaplasma*** pueden ser comensales o patógenos oportunistas aunque sólo en hospedadores vertebrados, principalmente aves y mamíferos (primates, ungulados y carnívoros) (Robertson y Taylor-Robinson, 2010).

Por su parte, los géneros ***Eperythrozoon*** y ***Haemobartonella*** comprenden especies hemotrópicas que pueden infectar mamíferos, incluyendo humanos; produciendo anemia crónica entre otros síntomas (Brown et al., 2010G; 2010H).

Los representantes de los géneros ***Entomoplasma*** y ***Mesoplasma***, entretanto, han sido aislados de artrópodos (insectos) y plantas, no existiendo evidencias de su patogenicidad, por lo que se ha asumido que son parte de su población bacteriana inocua (Brown et al., 2010D y 2010E). Por otra parte, mollicutes del género ***Spiroplasma*** han sido aislados de la superficie de las flores y otras partes de plantas, así como del tracto digestivo y hemolinfa de varios insectos y crustáceos. También han sido aislados en fluidos de plantas vasculares (savia del floema) y de los insectos que se alimentan de ellos. Algunas especies son patógenas de plantas o insectos (Williamson et al., 2010). Otras especies patógenas de plantas e insectos son los **fitoplasmas** (género

“*Candidatus Phytoplasma*”), afectando el rendimiento de algunos cultivos en todo el mundo (Oshima et al., 2013).

El género ***Acholeplasma***, por su parte, corresponde a especies saprófitas, encontradas en el suelo, materia orgánica en descomposición y aguas residuales; o bien como especies comensales de vertebrados, insectos o plantas. Hasta hace pocos años se creía que ninguna especie de este género podía actuar como patógeno primario, sin embargo, existen dos estudios mostrando que *Acholeplasma (A.) axanthum* actúa como patógeno en polluelos y embriones de gallina; mientras que *A. laidlawii* puede causar alteraciones en la organización ultraestructural del arroz (Chernov et al., 2012). Se ha observado, además, que pueden causar efectos citopáticos en cultivos celulares. Este género posiblemente es el más común de los mollicutes encontrados en vertebrados, localizándose frecuentemente en su tracto respiratorio superior y en el urogenital (Brown et al., 2010C). Los géneros correspondientes a la familia *Anaeroplasmataceae* (***Anaeroplasma*** y ***Asteroleplasma***) se encuentran en el rumen de ovinos y bovinos y no existen evidencias de que sean patógenos (Brown et al., 2010B).

El género ***Hepatoplasma***, con su representante “*Candidatus Hepatoplasma crinochetorum*” es un simbiote encontrado en ocho especies de isópodos terrestres (Wang et al., 2004B; Fraune y Zimmer, 2008; Leclercq et al., 2014)

I.3.3.1.1 Patogenicidad y factores de virulencia

A pesar de que existe una clara asociación entre algunos mollicutes y ciertas enfermedades aún no existe mucha información sobre los mecanismos exactos que influyen en su patogenicidad.

Uno de los factores de patogenicidad observados deriva de la dependencia nutricional y metabólica que presentan los mollicutes. La necesidad de estar en estrecho contacto con las células del hospedador ha llevado al desarrollo de estructuras u

orgánulos especializados de ensamblaje o proteínas variables de superficie (Balish, 2006; Balish y Krause, 2006). Algunas especies no solo se adhieren a las células del hospedador sino que también pueden invadirla y penetrarla parcialmente (ej. *M. penetrans*) (Lo et al., 1992). Ahora bien, la producción de productos tóxicos propios del metabolismo de estas bacterias (peróxido de hidrógeno y radicales superóxido) pueden causar un daño oxidativo en la membrana de las células del hospedador a las cuales se han adherido (Almagor et al., 1984; 1986; Razin, 1991).

Otros posibles factores de patogenicidad son: **a)** la presencia de ureasas, que podrían producir amoniaco; **b)** la presencia de la fosfolipasa A2 en *Ureaplasma* spp., lo que influenciaría el metabolismo de la prostaglandina y podría generar problemas durante la gestación (Razin et al., 1998); **c)** la capacidad de fusionarse parcialmente con las células hospedadoras, incrementado así el daño causado por los radicales superóxido (Wang et al., 1993); y, por último, **d)** la composición de la cápsula externa de polisacáridos que podría reducir la capacidad de fagocitosis del organismo hospedador, favoreciendo así la colonización bacteriana (Marshall et al., 1995).

I.3.3.1.2 Enfermedades más importantes producidas por mollicutes

I.3.3.1.2.1 Animales importantes en veterinaria:

I.3.3.1.2.1.1 Aves

Los principales mollicutes patógenos de aves conocidos son aquellos que afectan la producción avícola. Se destacan tres especies: **a)** *M. meleagridis* que produce cuadros de aerosaculitis así como alteraciones musculo-esqueléticas y reproductivas en pavos (Kleven, 1998); **b)** *M. synoviae*, que ataca varias especies de aves causando procesos sinovíticos infecciosos y procesos respiratorios (Stipkovits y Kempf, 1996); y **c)** *M. gallisepticum*, que produce una enfermedad crónica respiratoria en gallináceas y la

sinusitis en pavos (Kleven, 1998). La acción de estos patógenos produce un impacto negativo y pérdidas en la avicultura industrial (Mohammed et al., 1987; Bradbury, 2005). Adicionalmente, se ha identificado otras dos especies que igualmente presentan características citopatogénicas, aunque aparecen con menor frecuencia: *M. iowae* (Al-Ankari y Bradbury, 1996) y *M. pullorum* (Moalic et al., 1997). Finalmente, también se ha comprobado que puede existir transmisión de estos agentes patógenos entre aves silvestres y domésticas, asunto que todavía es objeto de estudio (Poveda et al., 1990; Lierz et al., 2000; Luttrell et al., 2001).

1.3.3.1.2.1.2 Carnívoros (perros y gatos)

En perros y gatos han sido encontrados varios mollicutes representantes del género *Mycoplasma* y *Acholeplasma*, formando parte de la población bacteriana usual en el tracto respiratorio superior y en el genital, y muy pocas de ellas han sido asociadas a algún tipo de patología. En general, en perros están asociadas a infecciones en el tracto urinario y a prostatitis, epididimitis y orquitis; en gatos, con conjuntivitis, enfermedades del tracto respiratorio superior y piotórax; mientras que en ambas especies se asocian a procesos de bronconeumonía, infecciones (abscesos) del tejido blando y piel, meningoencefalitis y poliartritis (Sykes, 2014).

En perros se ha identificado *M. canis*, un patógeno oportunista asociado con cuadros de neumonía, uretritis, cistitis, infertilidad y complicaciones durante la gestación, (Chalker, 2005); además de relacionarse con meningoencefalitis granulomatosa y meningoencefalitis necrotizante (Barber et al., 2012). Su transmisión es por vía sexual o aerosol. Hay que destacar que esta especie también ha sido identificada en procesos de neumonía en humanos inmunodeprimidos (Armstrong et al., 1971). Sin embargo, los micoplasmas que actúan como patógenos directos en canes son *M. cynos* y el hemoplasma *M. haemocanis*. El primero es causante de neumonía, bronquitis e incluso, aunque más raramente, cistitis y es transmitido por aerosol (Rosendal y Vinther, 1977); mientras que el segundo puede localizarse en la sangre del hospedador y producir

anemia hemolítica, transmitiéndose a través de la picadura de garrapatas (Brown et al., 2006F). Por otra parte, se encontraron indicios que indicaban la presencia de *Mycoplasma* y *Ureaplasma* spp. en el semen y la orina de individuos que presentaban epididimitis purulenta e infertilidad (L'Abée-Lund et al., 2003) y *M. spumans* y *M. edwardii* en cuadros de poliartritis en ejemplares inmunodeprimidos. Esta última especie también fue identificada en el cerebro de un can de seis semanas que presentaba convulsiones (Ilha et al., 2010). El papel de los mollicutes encontrados en estos casos todavía no está claro, debido a que los hospedadores se encontraban inmunodeprimidos por otras infecciones lo que podría haber permitido su desarrollo (Sykes, 2014).

Igualmente, en gatos han sido encontrados *Mycoplasma* spp. asociados a conjuntivitis y a enfermedades del tracto respiratorio superior, así como queratitis ulcerativa, aunque en esta última enfermedad se cree que puedan tener un papel secundario, desarrollándose una vez que el hospedador está inmunodeprimido debido a infecciones por herpesvirus 1 (FHV1) (Sykes, 2014). En gatos, además, también se encuentra una especie de hemoplasma: *M. haemofelis* que, al igual que su homólogo en canes, produce anemia hemolítica y tiene como vía de transmisión la picadura de pulgas (Woods et al., 2005). La segunda especie patógena importante en gatos domésticos es *M. felis*, el que está asociado con conjuntivitis, rinitis, queratitis ulcerativa, artritis y poliartritis (Liehmann et al., 2006) y meningoencefalitis (Beauchamp et al., 2011). Hasta ahora su modo de transmisión aún no está totalmente claro. Además, esta especie también fue aislada del líquido sinovial de un humano inmunocomprometido (Lemcke, 1979). Finalmente, *M. gateae*, al igual que *M. felis*, ha sido relacionado con poliartritis (Liehmann et al., 2006).

Por último, hay que destacar que han sido identificadas nuevas especies de hemoplasmas: “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” y “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” en gatos y “*Candidatus Mycoplasma haemoparvum*” en perros que han sido asociadas también a cuadros de anemia, aunque todavía su identificación y rol son objeto de estudio (Sykes y Tasker, 2014).

I.3.3.1.2.1.3 Rumiantes y porcinos

Son varias las especies de mollicutes, exclusivamente del género *Mycoplasma*, que afectan a animales de producción, causando muerte, haciendo descender las tasas de fertilidad y producción de leche o produciendo abortos.

El ganado bovino es afectado principalmente por dos especies: *M. mycoides* subsp. *mycoides* “Small Colony” que produce la Pleuroneumonía Contagiosa Bovina, enfermedad que causó grandes pérdidas mundiales durante el siglo pasado (Westberg et al., 2004), y que continúa siendo un problema sanitario en África y Asia (Lesnoff et al., 2004; Fischer et al., 2012); y por *M. bovis* que está relacionado con mastitis y con procesos poliartríticos y urogenitales (Pfützner y Sachse, 1996; Nicholas y Ayling, 2003). En los pequeños rumiantes uno de los principales patógenos es *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*, ya que produce Pleuroneumonía Contagiosa Caprina, una enfermedad caracterizada por cuadros respiratorios graves y elevada mortalidad y que actualmente tiene un enorme impacto en el ganado caprino de África y en algunas zonas de Asia (Mc Martin et al., 1980; Nicholas y Churchward, 2012); mientras que las especies *M. agalactiae*, *M. mycoides* subsp. *capri*, *M. capricolum* subsp. *capricolum* y *M. putrefaciens* pueden afectar al ganado caprino y ovino, ocasionando mastitis, artritis y queratoconjuntivitis, participando así en la producción del Síndrome de Agalaxia Contagiosa, el cual puede cursar con gravedad y es endémico en el área mediterránea (Bergonier y Berthelot, 2008). Por otra parte, el ganado porcino es susceptible a *M. hyopneumoniae* que actúa como el agente etiológico de la Neumonía Enzoótica Porcina (NEP), una enfermedad que tiene un gran impacto negativo directo en la producción porcina (Kobisch y Friis, 1996; Thacker, 2006; Maes et al., 2008) así como por la asociación con otras bacterias (Veenhuizen, 1998) y virus patógenos, como el del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (Thacker, 2001); el virus de la Influenza Porcina (Thacker et al., 2001); y el Circovirus porcino (Kim et al., 2003) en el denominado “Complejo Respiratorio Porcino”. Los micoplasmas *M. hyosynoviae* y *M. hyorhinis* también pueden producir cuadros de artritis y poliserositis, especialmente en animales jóvenes (Kobisch y Marois, 2008). Por último, se ha observado que *M. suis*,

una especie hemotrópica e incultivable, actúa como patógeno en porcinos domésticos y salvajes, produciéndoles un grave cuadro de anemia (Hoelzle et al., 2007; Groebel et al., 2009; Hoelzle et al., 2010).

1.3.3.1.2.2 Humanos

Los patógenos primarios más importantes que afectan a los humanos son *M. pneumoniae*, *M. hominis*, y *M. genitalium* (Krause y Taylor-Robinson, 1992; Blanchard y Bébéar, 2002). El primero de ellos está relacionado con complicaciones de tipo respiratorio, especialmente cuadros de bronquitis infecciosa (Atkinson et al., 2008), los que pueden derivar en complicaciones de tipo dermatológico (Schalock et al., 2006), artrítico (Ramírez et al., 2005) o cardiovascular (Meseguer et al., 2003), pudiendo afectar incluso al sistema nervioso central (Powers y Johnson, 2012). *M. hominis*, por su parte, es un parásito comúnmente asociado al tracto urogenital femenino cuando hay cuadros de vaginitis, vaginosis bacteriana e infecciones intrauterinas (Keane et al., 2000); asociándose también al aumento de la mortalidad y morbilidad perinatal debido a la capacidad que tiene de acceder al feto (Waites et al., 1988; Gonçalves et al., 2002). *M. genitalium*, por otra parte, se presenta en cuadros de uretritis no gonocócicas en hombres (Gambini et al., 2000; Jensen, 2004) y, al igual que la especie anterior, está asociado a procesos urogenitales infecciosos en mujeres (Baseman et al., 2004; Blaylock et al., 2004). Coloniza principalmente el área vaginal aunque también puede causar cervicitis (Manhart et al., 2001; Casin et al., 2002).

Existen otras especies de micoplasmas que a pesar de no ser patógenos primarios, pueden estar asociados a ciertas patologías como *M. penetrans* que está asociado con las infecciones de VIH (virus de la inmunodeficiencia humana) y es considerado un patógeno de alto riesgo (Tully, 1993; Blanchard, 1997; Blanchard et al., 1997; Waites y Talkington, 2005). Por otra parte, se sospecha que *M. fermentans* (Gilroy et al., 2001), y *M. salivarium* (Watanabe et al., 1998) podrían estar asociados a procesos

artríticos, mientras que *M. hyorhinis* (Huang et al., 2001) y otros *Mycoplasma* spp. han sido localizados en carcinomas (Zhao et al., 2006).

En la literatura se encuentra asimismo casos de infecciones zoonóticas como aquella asociada a *M. phocicerebrale* (Baker et al., 1998) el cual es un habitante de la boca de focas y leones marinos, pero que al ser inoculado en seres humanos a través de una mordedura produce la enfermedad ocupacional “seal finger”. Igualmente, se ha observado que sujetos inmunodeprimidos pueden ser susceptibles a este tipo de infecciones como es el caso de un paciente con VIH en el cual fue identificado *M. haemofelis*, una especie patógena que afecta a gatos (Lemcke, 1979, Dos Santos et al., 2008); y otros casos de humanos inmunodeprimidos en los que ha sido identificado *M. canis*, un patógeno de canes asociado a cuadros de neumonía (Armstrong et al., 1971).

Además, dentro del género *Ureaplasma* se encuentran dos especies que son patógenas en humanos: *Ureaplasma parvum* y *U. urealyticum* las cuales pueden localizarse en el tracto genital femenino y producir infecciones e infertilidad, pudiendo provocar complicaciones en el embarazo y afectar al desarrollo fetal (Huang et al., 2013; Kasprzykowska et al., 2013).

I.3.4 MOLLICUTES Y ORGANISMOS ACUÁTICOS

I.3.4.1 Invertebrados

Existen estudios que han encontrado mollicutes en algunos invertebrados acuáticos: briozoos, cnidarios, ctenóforos, moluscos y una gran variedad de crustáceos.

El primer registro de micoplasmas en invertebrados fue realizado por Zimmer y Woollacott (1983) quienes observaron (por microscopía electrónica) que sobre la superficie corporal de larvas y adultos del briozoo marino *Watersipora (W.) cucullata* se encontraban unas formas celulares procariotas de 3-14 µm de diámetro que carecían de

pared celular, muy semejantes a mollicutes. Fueron denominadas organismos “tipo-micoplasmas” (*Mycoplasma-like*). Los autores sugirieron una posible relación de simbiosis entre ambas especies. En un estudio posterior realizado por Boyle y colaboradores (1987) fue identificada una especie de *Acholeplasma* en larvas y adultos de otro briozoo marino, *W. arcuata*. Fue caracterizado a partir de cultivos, microscopía electrónica, pruebas bioquímicas, la proporción de Guanina + Citosina en su ADN y por pruebas serológicas. Todas estas observaciones deben ser tomadas con discreción debido a que en las fechas en que fueron realizadas aún no se contaba con técnicas como la PCR que pudieran caracterizar e identificar de forma determinante y segura los “potenciales” mollicutes observados.

Dentro del filo Cnidaria también se han encontrado micoplasmas. A través de PCR, Penn y colaboradores (2006) detectaron un representante de la familia *Mycoplasmataceae* en corales de aguas someras de Alaska. Posteriormente, y empleando la hibridación fluorescente *in situ* y PCR, fue posible detectar una bacteria igualmente perteneciente a la familia *Mycoplasmataceae* en los tentáculos del coral *Lophelia pertusa* (Neulinger et al., 2008). El micoplasma encontrado fue posteriormente denominado “*Candidatus Mycoplasma coralicola*” (GenBank: AM911412) (Neulinger et al., 2009). Tales resultados fueron confirmados por Kelloggy y colaboradores (2009) quienes detectaron la misma especie de micoplasma más otros 15 adicionales en la misma especie coralina, sugiriendo que se trataría de especies simbiotes específicas de este coral. Adicionalmente, en el GenBank es posible encontrar la información genética de 14 clones de *Mycoplasma* sp. (DQ917809 - DQ917899) hallados en el coral *Muricea elongata* (Ranzer et al., No publicado). Finalmente, Work y Aeby (2011) sugieren que los mollicutes podrían estar asociados a lesiones detectadas en corales, pero que sería necesaria su verificación experimental.

Daniels y Breitbart (2012) a través de técnicas de PCR identificaron *Mycoplasma* sp (GenBank: JN653273) y *Spiroplasma* sp. (GenBank: JN653133) en la ctenóforos

Mnemiopsis leidy y *Beroe ovata*, respectivamente, como parte de su población bacteriana normal.

Por otra parte, el primer registro de mollicutes en moluscos corresponde al de Harshbarger y colaboradores (1976) en cuyo estudio observaron (por microscopía electrónica) estructuras procariotas “tipo-micoplasmas” en la superficie de las células caliciformes del tracto digestivo de la ostra *Crassostrea virginica*. Gracias al avance de estudios de identificación y caracterización de micoplasmas a través de técnicas de PCR, ha sido posible determinar que algunas especies parecen ser parte de la micro población normal de algunos moluscos. En el estómago de *C. virginica*, por ejemplo, fue observado que un micoplasma cercano (93% de similitud al comparar el gen 16S del ARNr) a *M. mobile* representaba hasta el 80% de la población bacteriana total (King et al., 2012). En esta misma línea, aunque no siendo la especie bacteriana predominante, se han encontrado mollicutes en *Crassostrea gigas* (Fernández-Piquer et al., 2012), en la glándula digestiva de la ostra *Saccostrea glomerata* (Green y Barnes, 2010) y en el tracto digestivo de los abalones *Haliotis discus hannai* (Tanaka et al., 2004), *H. diversicolor* (Huang et al., 2010) y *H. gigantea* (GenBank: AB621871; Iehata et al., No publicado). Adicionalmente, en el tracto digestivo de la liebre de mar *Elysia rufescens* fueron encontradas cinco especies desconocidas del género *Mycoplasma* y cuatro más sobre el alga *Bryopsis* sp de la cual se alimenta el molusco, las que según los autores podrían tener alguna relación con los encontrados en el molusco (Davis et al., 2013). Hay que destacar que han sido encontradas algunas nuevas especies de mollicutes asociadas a esta alga (Hollants et al., 2013). En todos estos estudios la identificación ha sido realizada a través del análisis de una parte de la secuencia del gen ARNr 16S.

Por otra parte, hay estudios que han mostrado que los mollicutes pueden comportarse como patógenos potenciales en ciertos moluscos bivalvos, siendo asociados con algunos daños en los hospedadores, pero no como causantes de mortalidad (Paillard et al., 2004; Romalde y Barja, 2010). A través de fotografías de microscopía electrónica fueron observadas estructuras que coincidían con mollicutes

infectando el músculo aductor de *Patinopecten yessoensis* (Bower y Meyer, 1991) o bien libres en el citoplasma de las células epiteliales del divertículo digestivo de *Pecten novaezelandiae* y *Chlamys delicatula* (Hine y Diggles, 2002). Un caso interesante es el del berberecho *Cerastoderma edule* cuya mortalidad masiva fue asociada a la presencia de estructuras que corresponderían a mollicutes, localizadas en el citoplasma de las células epiteliales de las branquias; sin embargo, el estudio no fue concluyente y sólo se teorizó acerca del papel de los supuestos mollicutes (Azevedo, 1993)

Finalmente, a través de PCR y fragmentos del gen ARNr 16S, fue posible encontrar cinco tipos de mollicutes, cuatro del género *Mycoplasma*; y un *Spiroplasma*, todos en el tracto digestivo del pulpo *Octopus mimus*. La identificación de las especies se hizo a través del ADN encontrado, sin embargo no fue posible cultivar ninguna de ellas (Ishihata et al., 2013).

También han sido encontrados mollicutes en crustáceos. Al igual que en moluscos, los primeros antecedentes corresponden a observaciones a través de microscopía electrónica de estructuras procariotas “tipo-micoplasmas” que se identificaban como mollicutes. Krol y colaboradores (1991) observaron en las células epiteliales del hepatopáncreas de camarón blanco (*Penaeus vannamei*) unas formas espirales y helicoidales; identificando estas últimas como *Spiroplasma* sp. y las otras como algún tipo de mollicutes desconocido. Lo mismo sucedió con *P. japonicus* en cuyo hepatopáncreas fueron observadas formas filamentosas que también fueron identificados como algún tipo de mollicutes (Choi et al., 1996); en el caso de *P. chinensis* los mollicutes fueron asociados con la enfermedad de “gut-node” (Yang y Wu, 1992; Jifang, 1998); y con *Cherax quadricarinatus*, en el que tales estructuras fueron encontradas en las células epiteliales de su cutícula y que fueron asociadas, con degeneración celular y posterior muerte del crustáceo (Jiménez et al., 1998). Todos estos estudios estaban basados principalmente en fotos y en algunas pruebas muy generales y poco sensibles, por lo que sus resultados llegaron a ser cuestionados (Frellet et al., 1992).

Al igual que en estudios con otros organismos, el empleo de las técnicas de genética molecular (PCR e hibridación de ADN) permitió la detección e identificación fiable de los mollicutes encontrados en crustáceos. De tal manera, Ghadersohi y Owens (1999) encontraron dos nuevas especies de *Mycoplasma* (MP1 y MP2) en branquias, cerebro y ojos de langostinos moribundos *Penaeus monodon*. Los autores sugirieron estudiar el posible papel que pueden jugar los micoplasmas produciendo o permitiendo el desarrollo de algunas enfermedades en esa especie. Posteriormente, una de las especies encontrada fue nombrada como *M. monodon* (GenBank: AF042194.1; Ghadersohi y Owens, no publicado). Adicionalmente, Chaiyapechara y colaboradores (2011), estudiando la población bacteriana intestinal en esta especie de camarón, detectaron a través de PCR-DGGE a *M. corogypsi* y un *Mycoplasma* sp., aunque ninguno de ellos fue asociado a algún tipo de patología.

Por otro lado, Chen y colaboradores (2011B) identificaron, a través de PCR y de cultivo, una nueva especie de *Acholeplasma* sp (GenBank: GU985440) presente en las células branquiales de cangrejos *Scylla serrat* afectados por la enfermedad "Clearwater". Estudios paralelos con microscopia electrónica habían encontrado en los órganos afectados por dicha enfermedad (hepatopáncreas, branquias y estómago) un reovirus y estructuras que se asemejaban a mollicutes (Chen et al., 2011A), por lo que los autores plantearon que este mollicutes podría actuar como un cofactor del reovirus durante el desarrollo de la enfermedad.

También han sido encontrados mollicutes del género *Spiroplasma* que en crustáceos actúan como patógenos, pudiendo localizarse en la hemolinfa, tejido conectivo (tracto digestivo, hepatopáncreas y músculo cardiaco) y músculo de los hospedadores (Liang et al., 2011; Wang, 2011B). El "síndrome del muerto parado" en *Penaeus vannamei* es producido por *Spiroplasma penaei* (Nunan et al., 2004 y 2005; Altamiranda et al., 2011); mientras que la enfermedad del "tremor" en el cangrejo de agua dulce *Eriocheir sinensis*, *P. vannamei* y en *Procambarus clarkii* lo es por *Spiroplasma eriocheiris* (Wang et al., 2004A; 2005; Ding et al., 2007; Bi et al., 2008;

Wang et al., 2011). Ambas enfermedades producen altas mortalidades en los cultivos comerciales de estas especies.

En el langostino *Macrobrachium rosenbergii* también fue detectado (microscopia electrónica y PCR) un *Spiroplasma* sp. (GenBank: HQ692058) patógeno, el cual produce mortalidad al afectar los hemocitos y el tejido conectivo del hepatopáncreas, tracto digestivo y músculo cardíaco del crustáceo (Liang et al., 2011).

Debido a que hay mollicutes del género *Spiroplasma* que afectan a crustáceos de importancia comercial se han realizado estudios filogenéticos y se ha trabajado en perfeccionar técnicas de PCR, convencional y *real-time*, para su rápida detección (Ding et al., 2007; Bi et al., 2008; Heres y Lightner, 2010; Ding et al., 2013).

Una excepción a la asociación de mollicutes con enfermedades ocurre en el camarón marino *Rimicaris exoculata* que alberga en su tracto digestivo dos especies muy relacionadas con el orden *Entomoplasmatales* y cercanas a los géneros *Spiroplasma* y *Mycoplasma* como parte de su población intestinal, sin perjuicio alguno para él (Zbinden y Cambon-Bonavita, 2003). Algo similar acontece con la cigala *Nephrops norvegicus*, en cuyo tracto digestivo fue encontrado un mollicutes cercanamente relacionado con los clones Ty-Hep1.19 (GenBank: EU646197.1) y Lo-Hep 1.15 (GenBank: EU646198) de "*Candidatus* Hepatoplasma" encontrados en isópodos terrestres como parte de la flora bacteriana intestinal residente (Fraune y Zimmer, 2008; Meziti et al., 2012).

1.3.4.2 Peces

En peces se han llevado a cabo pocos estudios de aislamiento o identificación de mollicutes. La única especie aislada, cultivada y caracterizada en este grupo corresponde a *Mycoplasma mobile*, aislada de branquias de tenca (*Tinca tinca*) con eritrodermatitis (Kirchhoff et al., 1987). El resto de estudios siempre ha conseguido

detectar la presencia de mollicutes, a través de la secuenciación de porciones del gen ARNr 16S, pero nunca cultivar la especie. La mayoría han sido estudios de identificación de las poblaciones bacterianas en el tracto digestivo de peces que han conseguido encontrar mollicutes formando parte de la población bacteriana normal.

En ejemplares salvajes de salmón del Atlántico, *Salmo salar*, se detectó que *Mycoplasma* sp. (GenBank: AY065998.1) podía llegar a representar hasta el 96% de la población bacteriana intestinal (Holben et al., 2002). Estudios posteriores confirmaron la presencia de mollicutes en este salmónido al detectar por PCR dos representantes de *Mycoplasma* sp. en intestino [GenBank: FJ560444 (Dionne et al., 2009); GenBank: KC169759 (Green et al., 2013)]. Empleando la misma técnica fue detectado un representante de la familia *Mycoplasmataceae* (GenBank: DQ318957) en el bazo de ejemplares de bacalao (*Gadus morhua*) (Nylund et al., 2006). Posteriormente, y por medio de DGGE, fue encontrado un *Mycoplasma* sp. (*Mycoplasma moatsii* 95%, porción del gen ARNr 16S) en larvas de esta misma especie 28 días después de su eclosión, en dos ciclos de producción con un año de diferencia (McIntosh et al., 2008). Este mismo micoplasma fue encontrado también en el tracto digestivo del pez antártico *Notothenia coriiceps* (Ward et al., 2009).

Por otra parte, empleando una técnica de trazado molecular con fluorescencia T-RFLP, fue encontrado el ADN de un mollicutes muy cercano al género *Acholeplasma* (GenBank: AY590187) en el tracto digestivo del pez herbívoro marino *Kyphosus sydneyanus* (Moran et al., 2005). Mientras que en el tracto digestivo del pez de agua salobre *Gillichthys mirabilis* fueron identificados siete especies de mollicutes (GenBank: DQ340193 – DQ340199) (Bano et al., 2007). Una especie de *Mycoplasma* sp. muy similar a una de los anteriores (GenBank: DQ340193 95,3% ARNr 16S) fue detectada también en el intestino de la trucha *Oncorhynchus mykiss* (Kim et al., 2007). En el intestino de la caballa *Scomber scombrus* también fue posible, a través de DGGE, detectar un *Mycoplasma* sp. (*Mycoplasma iguanae* 97%, porción del gen ARNr 16S) (Svanevik y Lunestad, 2011). Wang (2011A), por otro lado, identificó un *Mycoplasma* sp.

(GenBank: HM031446) y un *Spiroplasma* sp. (GenBank: HM031425) (Wang y Lui, no publicado) en el intestino del lenguado *Kareius bicoloratus* y de la corvina *Sciaenops ocellatus*, respectivamente. En la población bacteriana intestinal del bagre *Pelteobagrus fulvidraco* fueron identificados tres representantes de la familia *Mycoplasmaceae* (GenBank: GU293190, GU293201, GU293212) similares a “*Candidatus Hepatoplasma*” encontrado en crustáceos; y un *Spiroplasma* sp. (GenBank: GU293217) (Wu et al., 2012); en tanto que en el intestino de la lamprea *Petromyzon marinus* fueron encontrados ocho clones de *Mycoplasma* sp (GenBank: JX453991-JX453916) y treinta y seis de *Ureaplasma* sp. (GenBank: JX453994-JX453980) (Tetlock et al., 2012). Por lo demás, existen registros de mollicutes encontrados en peces pero de los cuales sólo se tienen porciones de secuencias del gen ARNr 16S o su ISR, pero que no han sido publicadas formalmente en artículos o revistas, como es el caso del *Mycoplasma* sp. (GenBank: AB649427) encontrado en el intestino del pez globo *Takifugu obscurus* (Li et al., no publicado); el *Mycoplasma* sp. (GenBank: FR799684) en el salmónido *Coregonus migratorius* (Sukhanova et al., no publicado); y el *Mycoplasma* sp. (GenBank: HM489893) y *Ureaplasma* sp. (GenBank: HM446526) detectados en la corvina *Pseudosciaena crocea* (Zhang y Feng, no publicado).

Finalmente, un registro interesante es el de Windsor y colaboradores (2010), quienes aislaron y caracterizaron (a través de pruebas bioquímicas y la secuenciación del gen ARNr 16S) una especie nueva de micoplasma en muestras obtenidas de las branquias del lenguado *Microstomus kitt*, sin embargo, el estudio aún no ha sido publicado en ninguna revista. Algo similar ocurre con el estudio de Sukhanova y colaboradores (2011) quienes afirman haber detectado ADN, así como cultivado, micoplasmas aislados del intestino de los salmonídeos *Thymallus baicalensis nigrescens* (*Mycoplasma* sp. GenBank: FM897201-FM897203), *Thymallus* sp. (*Mycoplasma* sp GenBank: FR799679) y *Thymallus baicalensis* (*Mycoplasma* sp. GenBank: FR799681-FR799683). La única referencia aportada por los autores es que las especies encontradas serían muy similares a las identificadas en *Notothenia coriiceps* (Ward et al., 2009) y *Oncorhynchus mykiss* (Kim et al., 2007), pero no dan referencias más detalladas

de su cultivo aparte de decir que fue usado un kit de detección e identificación para *M. hominis*, para determinar su crecimiento, que fue conseguido después de 24h de incubación, y llegando a una concentración de 10^4 CFU/ml, sin embargo, parece ser que no continuaron con su cultivo. Estos mismos autores posteriormente consiguieron caracterizar el ADN del micoplasmas encontrado designándolo como “bailakian Mycoplasma genotype” y diseñando cebadores basados en el gen ARNr 16S específicos para su detección. Usando estos cebadores y a través de una PCR a tiempo real consiguieron detectar el micoplasma en el intestino de otros salmónidos de Siberia: *Coregonus migratorius*, *Coregonus lavaretus pidschian*, *Prosopium cylindraceum*, *Brachymystax lenok* y un híbrido (*Coregonus migratorius* x *Coregonus lavaretus pidschian*) (Sukhanova et al., 2014).

1.3.4.2.1 **Mycoplasma mobile**

1.3.4.2.1.1 Identificación

El único mollicutes que ha conseguido cultivarse y describirse de peces es *M. mobile*. Fue encontrado en un estudio realizado por Kirchhoff y Rosengarten (1984) quienes muestrearon las branquias, piel, bazo e intestino de 85 ejemplares de diez diferentes especies de peces dulceacuícolas: 26 carpas (*Cyprinus carpio*), 24 tencas (*Tinca tinca*), 23 truchas (*Salmo trutta*), 3 anguilas (*Anguilla anguilla*), 2 siluros (*Silurus glanis*), 1 gurami perla (*Trichogaster leerii*), 1 cíclido (*Tropheus* sp.), 1 salmón (*Salmo salar*), 1 carasio (*Carassius auratus*) y 2 lampreas (*Lampetra planeri*), más una platija (*Pleuronectes platessa*), un pez marino. Las muestras fueron colocadas en medio Hayflick para 30 min después ser filtradas (0,8 μ m) e inoculadas (0,2 ml) en 2 ml de medio Hayflick modificado, Friis modificado, SP4 modificado o medio de Urea. Al mismo tiempo, fueron sembradas placas de Agar de cada uno de los medios utilizados con el inóculo antes de ser filtrado. Los medios con el inóculo filtrado y las placas fueron mantenidos a 17 ó 25 °C, una parte en condición aeróbica y otra anaeróticamente. Los

medios con el inóculo filtrado fueron sembrados en placas de agar entre 4 y 10 días después. Hay que hacer notar que los medios de cultivos utilizados incluían una fuente de colesterol (suero bovino, equino u ovino), esencial para el crecimiento de la mayoría de los mollicutes y un antibiótico β -lactámico (penicilina) para evitar el crecimiento de otras bacterias.

Pasado un tiempo de incubación (no indicado por los autores) fueron observadas colonias con la morfología típica de mollicutes en 16 de los 85 peces estudiados, creciendo en aquellas placas que habían sido sembradas con la muestras sin filtrar, provenientes de tenca, carpa y trucha; siendo la mayoría de muestras de branquias puestas en medio SP4 y en menor grado de muestras de branquias, piel e intestino puestas en medio Hayflick y de Urea. A pesar de tener tantas muestras positivas sólo fue posible subcultivar y mantener el cultivo vivo de las colonias provenientes de las branquias con eritrodermatitis de un ejemplar de tenca puestas en medio modificado Hayflick e incubado a 25 °C. La cepa fue designada como 163K. Pruebas posteriores mostraron que **a)** las placas mostraba colonias en forma de huevo frito, típicas de mollicutes, **b)** también crecía bien en medio Friis; **c)** en medio líquido presentaba un crecimiento flocular, indicando su tendencia a formar agregados; **d)** crecía bien bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas entre 17 y 30 °C, con un crecimiento óptimo a 25 °C; **e)** que no crecía en medios carentes de suero, haciéndolo débilmente en el medio agar sangre; **f)** era sensible a digitonina 1% (p/v); **g)** fermentaba glucosa pero no hidrolizaba arginina; **h)** en placas de medio Hayflick con suero equino producía películas y cristales, pero no si era con suero bovino o en medio Friis; **i)** era pleomórfico con forma de botella o ánfora (*flask-shape*) con un protrusión terminal ("*head-like*" structure) y **j)** que era móvil, desplazándose (*gliding*) sobre superficies. Esta última característica le facilitó su nombre *mobile* (latín) motil (Kirchhoff et al., 1987).

Posteriormente, se han realizado estudios para determinar su rol como patógeno y las estructuras y funciones involucrados en él (Kirchhoff et al., 1984; Stadtländer y Kirchhoff, 1990,1995; Adan-Kubo et al., 2012); determinándose que puede provocar

hemoadsorción con eritrocitos ovinos, equinos, bovinos y de trucha y carpa (Fischer y Kirchhoff, 1987). Asimismo, a través de pruebas de laboratorio se ha determinado que puede producir eritrodermatitis necrótica en branquias de tenca y de trucha arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Stadtländer et al., 1995)

Descripción formal (Kirchhoff et al., 1987; Williamson et al., 2010):

Mobile.; adj. *mobile*, motil

Células cónicas o con forma de botella y con una protrusión terminal diferenciada designada como estructura “head-like”. Las células muestran un rápido desplazamiento cuando se encuentra sobre superficies en dirección de la “head-like” (Miyata et al., 2000; 2002). Las colonias que crecen sobre medios sólidos tienen la típica forma de huevo frito. Crecen muy bien en medio de Aluotto suplementado con glucosa o arginina. Su rango de temperatura ideal para el crecimiento es de 17-30 °C y el crecimiento óptimo se obtiene a 25 °C (Kirchhoff et al., 1987). El contenido G+C de su ADN es de 24,9 mol%.

Patogenicidad: Causa eritrodermatitis necrótica en tenca (*Tinca tinca*). El modo de transmisión no ha sido determinado.

Fuente: Aislado de las branquias del pez dulceacuícola tenca con la “enfermedad roja” (infección de las branquias).

Cepa Tipo: 163K, ATCC 43663, NCTC 11711.

Nº de secuencia (gen ARNr 16S): M24480 (Weisburg et al., 1989).

Nº de secuencia (genoma completo de la cepa 163K): NC_006908 (Jaffe et al., 2004).

1.3.4.2.1.2 *Mycoplasma mobile* y movilidad

Dentro de los procariontes existen especies inmóviles y otras con capacidad de movimiento. Estas últimas emplean una amplia variedad de estructuras para poder desplazarse. Algunas, como ciertas cianobacterias y bacterias verdes del azufre, poseen vesículas de gas con las que pueden controlar su flotabilidad y así alcanzar un óptimo de luz y alimento subiendo y bajando en la columna de agua (Walsby, 1994). Otras poseen uno o más flagelos (Ej. familia *Vibrionaceae*) o utilizan pili de tipo IV (Ej. *Pseudomonas aeruginosa*) para generar fuerzas móviles mediante contracciones; mientras que otras se

deslizan sobre superficies, como es el caso de ciertas cianobacterias filamentosas, algunas especies del grupo Cytophaga-Flavobacterium y ciertos micoplasmas (Bardy et al., 2003; Jarrell y McBride, 2008).

Entre las especies de mollicutes que se movilizan por desplazamiento (*gliding*) se encuentran *M. pneumoniae*, *M. gallisepticum*, *M. pulmonis*, *M. genitalium*, *M. amphoriforme* y *M. mobile* (McBride, 2001; Shimizu y Miyata, 2002; Miyata, 2008). A pesar de que estas especies poseen un genoma mínimo han desarrollado sistemas que les permiten deslizarse sobre superficies. Carecer de pared celular les permite adoptar formas con características protrusiones de la membrana que usan para desplazarse (Uenoyama y Miyata, 2005A; Nakane y Miyata, 2007; Miyata, 2010).

Desde que *M. mobile* fue descrito su peculiar sistema de desplazamiento generó un amplio interés, por lo que ha sido objeto de muchos estudios. En general, se ha observado que tiene una forma celular especializada (forma de “botella” o “ánfora”) con una estructura terminal especializada o protrusión denominada “head-like” (Miyata y Uenoyama, 2002; Shimizu y Miyata, 2002); que puede adherirse fuertemente a superficies plásticas y de vidrio así como a células animales (Kirchhoff y Rosengarten, 1984; Kirchhoff et al., 1984); pueden desplazarse muy rápidamente (7 $\mu\text{m/s}$) sobre superficies inertes (Kirchhoff y Rosengarten, 1984; Kirchhoff et al., 1984; Jaffe et al., 2004) y sobre la de los eritrocitos (Fischer y Kirchhoff, 1987; Fischer et al., 1987); que exhiben comportamiento quimiotáctico en respuesta a varios compuestos (Kirchhoff et al., 1987; Piper et al., 1987) además de presentar reotaxis positiva (Rosengarten et al., 1988).

Existen muchos estudios que han descrito la composición y forma de membrana de esta especie, las proteínas asociadas al movimiento así como la fuente de energía que usa este micoplasma para conseguirlo (Fischer et al., 1988; Wu y Miyata, 2012). Se ha observado que el movimiento se produce de manera centrípeta, mediante unión, tracción y liberación por parte de múltiples proteínas de 50 ηm de longitud, las que en

conjunto con cuatro grandes proteínas localizadas en la base del “head-like” y sustentadas por un citoesqueleto interno, compondrían el sistema de desplazamiento, sirviendo de “piernas” y permitiéndole al micoplasma “caminar” sobre una superficie, así como lo haría un ciempiés (Piper et al., 1987; Miyata et al., 2002; Miyata 2008; 2010). Estas “piernas” tienen la capacidad de reconocer y adherirse a oligosacáridos sialilados (*con ácido siálico*) que se encuentran en la superficie de células animales pudiendo de esta manera invadirlas y desplazarse sobre ellas (Miyata et al., 2000; Nagai y Miyata, 2006; Kasai et al., 2013). Cuatro de estas proteínas han sido identificadas y caracterizadas estructural y funcionalmente: P42, Gli123, Gli349 y Gli521. (Uenoyama et al., 2004; Seto et al., 2005; Uenoyama y Miyata, 2005B; Adan-Kubo et al., 2006; Uenoyama et al., 2009; Nonaka et al., 2010). De manera complementaria, se ha podido observar y describir la estructura del citoesqueleto que tiene una forma de “medusa”, y está especializado también para el desplazamiento (Nakane y Miyata, 2007).

Se ha determinado, asimismo, que la energía requerida para el desplazamiento de este microorganismo proviene del trabajo metabólico de una ATPasa especializada (Jaffe et al., 2004; Miyata, 2008). Hasta ahora se ha identificado una nucleósido-trifosfatasa, la P42, que podría ser tal enzima, sin embargo, todavía faltan evidencias para poder confirmarlo certeramente (Ohtani y Miyata, 2007).

Por otro lado, existen estudios que han buscado la manera de aprovechar la movilidad y fuerza observadas en *M. mobile* (Hiratsuka et al., 2005; 2006). Se ha conseguido que esta bacteria se desplace sobre superficies inertes cubiertas con proteínas unidas a una molécula con ácido siálico, la sialilactosa. El micoplasma lo reconoce y se desplaza sobre él como si lo hiciera sobre una superficie celular animal (Nagai y Miyata, 2006). A partir de esto surgió la idea de crear una cepa que, a través de modificaciones químicas, expresara en la superficie de su membrana moléculas de biotina. A continuación se utilizó estreptavidina, un compuesto con alta afinidad con la biotina, para cubrir una superficie inerte, consiguiendo así que *M. mobile* se desplazara sobre ella, “estimulado” por la afinidad entre ambos compuestos, que hacía que

funcionara toda su maquinaria de desplazamiento (Hiratsuka et al., 2006). Todo este sistema fue instalado dentro de un motor de microrrotación dentro de una micromáquina de silicona de 20 μm de diámetro, “cargado” con glucosa como carburante, consiguiendo que la velocidad y fuerza del desplazamiento de los micoplasmas pudiera mover este motor y crear trabajo mecánico. De esta manera se consiguió con éxito un sistema híbrido que combinaba organismos vivos y sistemas artificiales para generar movimiento, esto es, un motor dirigido por bacterias (Hiratsuka et. al., 2006) (Video disponible en: <http://www.youtube.com/watch?v=oZVzJtK3vM0>).

Sin embargo, trabajar con microorganismos fuera del laboratorio comporta algún riesgo, sobre todo biológico, debido a la dificultad de controlarlos eficientemente y a su patogenicidad, por lo que se ha ideado la posibilidad de utilizar tal maquinaria bacteriana sin estar viva. Uenoyama y Miyata (2005A) consiguieron permeabilizar parcialmente la membrana de la bacteria, manteniendo la estructura de su citoesqueleto, logrando así matar a la bacteria pero dejar intacta las estructuras implicadas en el movimiento. El experimento resultó pues con la sola adición de ATP fue posible recuperar la movilidad original. La maquinaria implicada en el movimiento que queda dentro de la estructura bacteriana sin vida recibió el nombre de “ghost”.

Actualmente se está buscando un campo en el que pueda ser aplicado este sistema híbrido motor-bacteria.

1.3.4.3 Mamíferos marinos

A nivel mundial son muy pocos los estudios que se han realizado en identificación de mollicutes en mamíferos marinos. El primer registro corresponde a la identificación (a través de serología y fotos de microscopía electrónica) y descripción de tres especies de micoplasmas encontradas en ejemplares de foca de puerto (*Phoca vitulina*) en Norteamérica: *Mycoplasma phocae* (antes *M. phocidae*), *M. phocirrinis* y *M. phocicerebrale*. Todas ellas fueron detectadas en dos episodios en los que se produjeron

mortalidades masivas de *P. vitulina*, aunque no fue posible determinar una relación clara entre su presencia y la mortalidad de las focas, asumiendo que no correspondían a los patógenos primarios pero sí podrían contribuir al desarrollo de la infección (Geraci et al., 1982; Giebel et al., 1991; Ruhnke y Madoff, 1992; Higgins, 2000). Tiempo después, además, pudo identificarse *M. phocicerebrale* como el agente causante de la enfermedad zoonótica conocida como “Seal Finger” (Cowan et al., 2001; Hunt et al., 2008).

Posteriormente, fueron identificados cuatro nuevos micoplasmas en el león marino californiano (*Zalophus californianus*): en abscesos subdérmicos fue encontrado *M. zalophi* y *M. zalophidermidis* (Haulena et al., 2006); en los pulmones, *Mycoplasma* sp. CSL7503-lung (GenBank: EU714238); y en la sangre, “*Candidatus Mycoplasma haemozalophi* sp. nov.” (GenBank: GU905012-GU904996) (Volokhov et al., 2010 y 2011). *M. zalophi* fue asociado a la presencia de lesiones subdermales y musculares, así como a artritis y linfadenopatía (Haulena et al., 2006).

Paralelamente, Lynch y colaboradores (2011), analizando ejemplares juveniles y adultos del lobo marino australiano (*Arctocephalus pusillus doriferus*), y encontraron que 55 de 80 ejemplares aparentemente saludables presentaban tres micoplasmas en su cavidad nasal: *M. phocae*, *M. zalophi*, y *Mycoplasma* sp. (GenBank: EU714238). Estas dos últimas especies, además, también fueron aisladas en muestras de pulmón de juveniles mientras que en un adulto fue identificado *M. phocicerebrale*. Como no fue observado ningún tipo de lesión, se consideraron estas especies como parte de la población bacteriana normal. En los fetos, por el contrario, fueron observadas lesiones neumónicas y en algunos casos miocarditis o pericarditis. En los pulmones fetales estudiados fue detectado ADN de *Mycoplasma* sp. (*Mycoplasma* sp. Phocoena 94%-ARNr 16S GenBank: FJ876266), *Mycoplasma* sp. CSL7529-conjuntiva (GenBank: EU859984) y de *M. phocicerebrale*. Los autores indican la importancia de estudiar a fondo si alguna de estas tres especies de micoplasmas está relacionada con el aborto de tales fetos.

Finalmente, existen más especies de mollicutes que han sido descritas en pinnípedos, que poseen número de registro GenBank pero que aún no han sido formalmente identificadas. *Mycoplasma* sp. *Mirounga* (GenBank: JN644768) y *Ureaplasma* sp (GenBank: JF731006- JF731007) en el elefante marino *Mirounga angustirostris*; y diversas cepas de *Mycoplasma* sp. (GenBank: EU714237) y *Ureaplasma* sp (GenBank: HQ377524- HQ377518) en *Z. californianus*. Volokhov y colaboradores (2012B) han propuesto que estos *Ureaplasmas* que detectaron en *M. angulirostris* y en *Z. californianus* sean denominados “*Ureaplasma miroungigenitalium*” y “*Ureaplasma zalophigenitalium*”, respectivamente.

Por otra parte, en el sirénido *Trichechus manatus latirostris* ha sido encontrado un *Acholeplasma* sp. (GenBank: FJ590762.1) (Volokhov. No publicado)

En cetáceos, por otra parte, solamente se encuentra un estudio registrando la presencia de *M. phocicerebrale* (en un hígado y en tres pulmones) y *Mycoplasma* sp. (en un riñón y cinco pulmones) en ejemplares de Marsopa común (*Phocoena phocoena*), así como un *Mycoplasma* sp. en el riñón de un zifio de Sowerdy (*Mesoplodon bidens*) (Foster et al., 2011). Los autores indican la importancia de estudiar los efectos que puedan producir estas especies de micoplasmas sobre los hospedadores, teniendo en cuenta que en mamíferos terrestres pueden debilitar el sistema inmune o ser vectores directos de enfermedades. Además, en un análisis de las heces de la marsopa sin aleta (*Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis*) fueron encontradas dos especies de *Mycoplasma* sp. (GenBank: JN792315 - JN792314) y 47 secuencias de clones de *Ureaplasma* sp. (GenBank: JN792313 - JN792267) (Mc Laughlin et al., 2012).

En un ejemplar de delfín de dientes rugosos (*Steno bredanensis*) varado en las Islas Canarias fueron detectados los micoplasmas *M. opalescens* y *M. phocirhinis* en la abertura genital y útero, respectivamente. Ambas especies fueron cultivadas e identificadas a través de su secuencia de la ISR (Poveda et al., 2009).

Por otra parte, existen registro de nuevas especies encontradas en Marsopa común que aún no han sido descritas formalmente en ninguna publicación: *Mycoplasma* sp. Phocoena C-264-GEN (GenBank: GU905021), *Mycoplasma* sp. Phocoena C-269 (GenBank: FJ876266) (Volokhov y Gulland, no publicado) y cuatro *Mycoplasma* sp. (GenBank: FJ233100 - FJ233097) (McAuliffe et al., no publicado).

El estudio de mollicutes en este tipo de organismos es muy interesante y puede ser útil para conocer aspectos importantes de su ecología y fisiología, que son relevantes a la hora de determinar las causas que pueden llevar a un animal a morir y/o para realizar programas de manejo y protección basados en su biología.

Descripción de *Mycoplasma phocicerebrale* ((*correg*) Giebel et al., 1991; Williamson et al., 2010)

pho.ci.ce.re.bra'.le.; *phoca*, foca; *cerebrale*, perteneciente al cerebro; *phocicerebrale*, perteneciente al cerebro de una foca.

Células cocoides o mostrando una forma de mancuerna. No ha sido confirmada su motilidad. Las colonias que crecen sobre medios sólidos tienen la típica forma de huevo frito. Crecen muy bien en medio SP4 suplementado con arginina a 37 °C.

Patogenicidad: Asociado con enfermedades respiratorias y conjuntivitis en focas de puerto (Kirchhoff et al., 1989) y una clara queratitis ulcerativa debido a mordidas de focas (conocida como “*seal finger*”) y artritis secundarias en humanos (Baker et al., 1998). La transmisión entre focas de puerto no ha sido determinada definitivamente; la transmisión a humanos es de naturaleza zoonótica, debido a mordiscos de focas.

Fuente: Aislado del cerebro, fosas nasales, garganta, pulmones y corazón de focas de puerto (*Phoca vitulina*) durante un brote de enfermedades respiratorias (Kirchhoff et al., 1989) y desde lesiones de humanos con “*seal finger*” (Baker et al., 1998; Ståby, 2004)

El contenido G+C de su ADN es de 25,9 mol%.

Cepa Tipo: 1049, ATCC 49640, NCTC 11721.

Nº de secuencia (gen ARNr 16S): AF304323.

Comentarios: El nombre original de *phocacerebrale*, fue corregido por (Königsson et al., 2001).

Descripción de *Mycoplasma phocidae* (Ruhnke y Madoff, 1992; Williamson et al., 2010)

pho.ci'.dae.; *phoca*, foca; *phocidae* de una foca.

Células cocoides primarias. No ha sido confirmada su motilidad. Las colonias que crecen sobre medios sólidos tienen la típica forma de huevo frito. Crecen muy bien en medio SP4 o Hayflick suplementado con arginina a 37 °C. Produce la reacción de "Películas y Cristales".

Patogenicidad: Patógeno oportunista, asociado con neumonía secundaria en focas de puerto (Kirchhoff et al., 1989) y subsecuente infección por influenza. No ha sido posible producir la enfermedad en focas de puerto o focas grises a partir de un cultivo puro de *M. phocidae* (Geraci et al., 1982). Su forma de transmisión no ha sido determinada definitivamente.

Fuente: Aislado de pulmones, tráquea y corazón de focas comunes (*Phoca vitulina*).

El contenido G+C de su ADN es de 27,8 mol%.

Cepa Tipo: 105, ATCC 33657.

Nº de secuencia (gen ARNr 16S): AF304325.

Comentarios: La designación de la especie como "*Mycoplasma phocae*" fue sugerido (Königsson et al., 2001), sin embargo, el nombre original "*phocidae*" fue conservado.

Descripción de *Mycoplasma phocirhinis* ((correg) Giebel et al., 1991; Williamson et al., 2010)

pho.ci.rhi'.nis.; *phoca*, foca; *rhis*, *rhinos*, nariz; *phocirhinis*, de la nariz de foca.

Células cocoides. No ha sido confirmada su motilidad. Las colonias que crecen sobre medios sólidos usualmente tienen la típica forma de huevo frito. Crecen bien en medio Friis o Hayflick a 37°C. Produce la reacción de "Películas y Cristales".

Patogenicidad: Asociado con enfermedades respiratorias y conjuntivitis en focas de Harbor (Kirchhoff et al., 1989). Su forma de transmisión no ha sido determinada definitivamente.

Fuente: Aislado de fosas nasales, faringe, pulmones, tráquea y corazón de focas de común (*Phoca vitulina*).

El contenido G+C de su ADN es de 26,5 mol%.

Cepa Tipo: 852, ATCC 49639, NCTC 11722.

Nº de secuencia (gen ARNr 16S): AF304324.

Comentarios: El nombre original de *M. phocarhinis*, fue corregido por Königsson y colaboradores (2001).

Descripción de “*Mycoplasma zalophi*” (en estudio) (Haulena et al., 2006; Williamson et al., 2010)

za.lo´phi.; *zalophi*, de *Zalophus*, el género de león marino que incluye el León marino de California (*Zalophus californianus*) del cual fue aislado este micoplasma.

Su morfología celular aún no ha sido descrita.

Fuente: Aislado de un absceso subdérmico de un león marino en cautividad.

Hospedador habitual: Abscesos subdérmicos e intramusculares, articulaciones, pulmones y ganglios linfáticos de leones marinos en cautividad.

Filogenia: Asignado al Clúster *Mycoplasma hominis* del Grupo Hominis del género *Mycoplasma*.

Cultivo: Cultivable en medio SP4 suplementado con glucosa.

Temperatura óptima de crecimiento: 37 °C.

Nº de secuencia (gen ARNr 16S): AF493543.

CAPÍTULO II: Estudio metodológico – Evaluación de la sensibilidad y especificidad de seis pares de cebadores utilizados en la detección e identificación de microorganismos de la Clase *Mollicutes*

II.1 ANTECEDENTES

Los microorganismos pertenecientes a la clase *Mollicutes* son los organismos más pequeños capaces de replicarse en medios de cultivo exentos de células. Se distinguen de otras bacterias por su reducido tamaño y la ausencia total de pared celular. La clase contiene nueve géneros: *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Entomoplasma*, *Mesoplasma*, *Spiroplasma*, *Acholeplasma*, “*Candidatus Phytoplasma*”, *Anaeroplasma* y *Asteroleplasma*. El género *Mycoplasma* incluye organismos anteriormente pertenecientes a los géneros *Haemobartonella* y *Eperythrozoon*, siendo micoplasmas hemotrópicos (hemoplasmas). A pesar de que hasta ahora el término **micoplasma** ha sido empleado como sinónimo de la Clase *Mollicutes*, actualmente se recomienda usar el término mollicute, y micoplasma, acholeplasmas, mesoplasma, etc., cuando se hace referencia a los miembros del respectivo género (Brown et al., 2010F).

Todos los mollicutes son parásitos o comensales de vertebrados, insectos y plantas, encontrándose también algunas especies patógenas dentro de estos tres grupos (Brown et al., 2010F), incluyendo agentes de enfermedades listadas por la *World Organisation for Animal Health* (OIE) y de declaración obligatoria como la pleuroneumonía contagiosa bovina, agalaxia contagiosa, pleuroneumonía contagiosa caprina y micoplasmosis aviar por *M. gallisepticum* y *M. synoviae*.

Además de su importancia como agentes patógenos, los micoplasmas y acholeplasmas se consideran como algunos de los contaminantes más frecuentes e importantes de cultivos celulares, sueros y en la industria biofarmacéutica, desde la etapa de investigación hasta la fase de desarrollo clínico (Armstrong et al., 2010).

El uso de cultivos celulares de forma rutinaria se realiza en laboratorios de investigación científica, de diagnóstico y de desarrollo biotecnológico. A pesar de tener áreas específicas para la manipulación de cultivos celulares y disponer de equipos sofisticados en condiciones de esterilidad, la contaminación por agentes biológicos sigue

siendo un problema, que no sólo repercute en la pérdida del cultivo, sino también en la de todos los productos y/o resultados que deriven de él (Puerta et al., 2013).

Cuando los cultivos son contaminados por bacterias y hongos ambientales, éstos son fácilmente detectados por los cambios macroscópicos (pH, turbidez) y microscópicos (morfología celular) que generan en el cultivo. Sin embargo, otros tipos de patógenos no son fácilmente detectables y logran pasar inadvertidos por largos periodos de tiempo, como ocurre con diversos virus y mollicutes (Razin y Tully, 1996). Además, la contaminación de líneas celulares por micoplasmas es, con mucho, el problema más frecuente en cultivos celulares (Uphoff y Drexler, 2002).

Aunque existen alrededor de 120 especies conocidas de micoplasmas y acholeplasmas, solamente cerca de 20 especies han sido identificadas como contaminantes de cultivos celulares (Wirth et al., 1994). No obstante, en el 95% de cultivos contaminados han sido aislados *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. orale*, *M. hyorhinis* o *Acholeplasma laidlawii* (Garner et al., 2000). Algunos de ellos, como *M. orale*, *M. fermentans*, *M. salivarium* y *M. hominis*, forman parte de la población bacteriana normal del ser humano, por lo que el personal del laboratorio se convierte en una posible fuente de contaminación; mientras que *M. hyorhinis*, *M. arginini* y *Acholeplasma laidlawii* se pueden encontrar en reactivos de origen animal, como la tripsina o el suero fetal bovino no certificados para cultivos celulares (Puertas et al., 2013).

Al carecer de pared celular, los micoplasmas son resistentes a muchos de los antimicrobianos más utilizados en cultivos celulares (Molla Kazemiha et al., 2009). Además, al ser bacterias extremadamente pequeñas (130 y 300 nm) (Brown et al., 2010F), son indetectables con el microscopio óptico y no pueden ser eliminados por medio de la filtración con membranas convencionales de diámetros de poro entre 220 y 450 nm.

Por otra parte, su tasa de replicación en los cultivos es lenta por lo que la mayoría de las especies no genera lisis total de las células infectadas, lo que dificulta su detección temprana. Sólo en los cultivos que presentan una infección crónica se puede observar cambios en la morfología celular, disminución en la tasa de proliferación, alteración del metabolismo celular al competir por los nutrientes presentes en el medio, regulación de la respuesta inmune, aglutinación de las células infectadas, así como también un aumento en la sensibilidad de las células a la infección viral y al tratamiento con drogas (Lobo et al., 2006; Puerta et al., 2013). Sus efectos dependen de la especie de micoplasma contaminante, el tipo de célula infectada, las condiciones de cultivo y la intensidad y duración de la infección (Drexler y Uphoff, 2002). Estas infecciones pueden alterar los resultados de experimentos biológicos o la calidad de los productos biofarmacéuticos (Zhi et al., 2010).

La detección de contaminaciones biológicas en productos biofarmacéuticos constituye un punto importante dentro de los sistemas de calidad. Las agencias reguladoras presentan normas muy estrictas donde específicamente establecen la detección de micoplasmas como prueba determinante para la liberación o no de tales productos (Japanese Pharmacopoeia, 2006; European Pharmacopoeia, 2011).

En las últimas décadas se han desarrollado diferentes métodos de detección, los cuales varían en complejidad, tiempo y equipamiento necesario. Anteriormente, para su detección se utilizaban métodos de rutina como tinciones fluorescentes (tinción de Hoechst o DAPI), autorradiografía con [3H] timidina, inmunofluorescencia indirecta, o cultivo de colonias en agar sólido. También se ha desarrollado una variedad de inmunoensayos que, sin embargo, suelen detectar un número reducido de especies, lo que limita la prueba (Puerta et al., 2013).

El aislamiento en cultivo es esencial para una identificación definitiva del organismo, sin embargo, no es fácil conseguir el crecimiento de mollicutes, además de ser casi imposible identificarlos por su fenotipo (McAuliffe et al., 2003; Rebelo et al.,

2011). Otro método convencional de diagnóstico se basa en pruebas serológicas, como prueba de fijación del complemento, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o inmunotransferencia, sin embargo, pueden consumir mucho tiempo y carecen de sensibilidad y especificidad (Mc Auliffe et al., 2003).

Adicionalmente, se ha desarrollado métodos basados en la tecnología de amplificación del ácido nucleico (NAT) para detectar mollicutes (Kong et al., 2007) y las recomendaciones para la evaluación de los ensayos NAT para las pruebas de mollicutes fueron incluidas en la Farmacopea Europea (Kong et al., 2007; European Pharmacopoeia, 2011; Burgher et al., 2013). En los últimos años las técnicas moleculares de hibridación de ácidos nucleicos (HAN) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han sido ampliamente utilizadas en la identificación de micoplasmas (Wirth et al., 1994). La técnica de HAN requiere del desarrollo de sondas género-específicas como la H-900 y sondas específicas para diferentes especies. Si bien las técnicas HAN son más sensibles que el cultivo de micoplasmas, resultan ligeramente menos sensibles que la PCR (Lobo et al., 2006).

La aplicación de técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha atraído mucha la atención por presentar una alta sensibilidad y especificidad, por lo que se aplica en la actualidad en la determinación de especies de *Mollicutes* (Hopert et al., 1993; McAuliffe et al., 2003). Otras características que le han aportado popularidad a la técnica son su simplicidad, el tiempo asociado al análisis y su aplicación en productos y muestras biológicas. Todo esto ha llevado a mejorar la eficiencia y eficacia en la detección de mollicutes (Kong et al., 2007). Sin embargo, algunos métodos de PCR no son capaces de detectar algunas especies de *Mollicutes* por no tener un nivel de sensibilidad necesario para reemplazar a las pruebas generales de mollicutes basados en su cultivo (Eldering et al., 2004; Zhi et al., 2010).

Con la intención de incrementar la sensibilidad en el diagnóstico se ha desarrollado diferentes tipos de PCR tales como PCR anidada (Wirth et al., 1994) y RT-

PCR, esta última usa como molécula diana el ARN, cuyo número de copias es mayor en las células que su correspondiente AND (Brown et al., 2009). Otro tipo que se ha desarrollado y está cobrando gran importancia es la PCR a tiempo real (Harasawa et al., 2005; Ishikawa et al., 2006), la que es mucho más sensible y rápida que una PCR convencional, por lo que se han adaptado muchos protocolos a este tipo de PCR para una detección rápida de algunos mollicutes (Baczynska et al., 2004; Dubosson et al., 2004; Rebelo et al., 2011).

Se ha desarrollado métodos de PCR con diana en diferentes marcadores genéticos de mollicutes y se han aplicado para la detección de una variedad de agentes infecciosos donde la técnica tiene que ser especie específica. Sin embargo, cuando el objetivo es la detección simultánea de un amplio rango de especies de mollicutes, la PCR tiene que estar basada en regiones altamente conservadas como el gen ARNr 16S (Deng, et al., 1992; Van Kuppeveld et al., 1992; Sung et al., 2006), las regiones adyacentes a la región intergénica entre los genes ARNr 16S y 23S (ISR) (Harasawa, 1996; Tang et al., 2000; Ramírez et al., 2008) o el ARNr 23S (Hotzel et al., 2003). McAuliffe y colaboradores (2003) desarrollaron una técnica que combina la PCR con la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (*DGGE*) para micoplasmas. Se trata de un test genérico simple que permite la identificación de los microorganismos hasta un nivel de especie. Más recientemente, se ha desarrollado pruebas de *microarray* de ADN para la identificación de especies de micoplasmas (Volkhov et al., 2006; Schnee et al., 2012).

El objetivo de este estudio fue evaluar seis pares de cebadores respecto a su sensibilidad frente a una batería de mollicutes y su especificidad respecto a otras bacterias. Adicionalmente, los dos pares de cebadores con mejores resultados se adaptaron a una PCR a tiempo real.

II.2 MATERIALES Y MÉTODOS

II.2.1 ORGANISMOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

En las **Tablas II-1** y **II-2** se relaciona los microorganismos utilizados en el presente estudio. Todos los mollicutes fueron cultivados en el medio SP4-II (Ramírez et al., 1997) entre 2 a 5 días a condiciones atmosféricas normales y 37 °C, con la excepción de *Mesoplasma lactucae* y *Spiroplasma* spp., que se incubaron a 25 °C. Cada cultivo fue filtrado y clonado para asegurar su pureza. Las bacterias no-mollicutes fueron cultivadas en agar-sangre (Prodanisa) a 37 °C.

En el estudio se incluyó el ADN de trece especies bacterianas cedido, tras su identificación por métodos convencionales y de biología molecular, por el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas e Ictiopatología (IUSA/ Universidad de Las Palmas de Gran Canaria).

II.2.2 EXTRACCIÓN Y MEDICIÓN DE ADN

El ADN fue extraído utilizando el kit comercial *Realpure Genomic* (Real) y siguiendo sus instrucciones. Su concentración fue cuantificada en un espectrofotómetro *NanoDrop 1000* (Thermo Fisher Scientific). Para verificar la integridad del ADN en los casos con poca cantidad de ADN fue realizada una electroforesis (100 V por 50 min) en un gel de agarosa (1% p/v en tampón TAE 1x) teñido con Gel-Red (Biotium) (0,025 µl/ml) utilizando el marcador molecular Lambda DNA/HindIII (Thermo Scientific) y, posteriormente, visualizado en un transiluminador (Bio-Rad Laboratories). Para su análisis fue utilizado el software *Quantity-One* (Bio-Rad Laboratories).

Tabla II-1: Especies de microorganismos de la Clase *Mollicutes* utilizadas en la comparación de seis pares de cebadores de PCR's utilizadas para esta clase. Se muestra la detección de su ADN por cada protocolo de PCR, temperatura de fusión (°C) de la PCR a tiempo real empleando el par de cebadores N° 4 y 5 y la concentración de ADN de la especie analizada.

| Mollicutes | Cepa | PCR's ^a | | | | | | Temperatura de fusión (°C) ^b | Concentración de ADN (ng/μl) |
|---|-----------------|--------------------|---|---|---|---|---|---|------------------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | | |
| <i>Acholeplasma (A.) granularum</i> | BTS-39 | - | + | + | + | + | ± | 86,5 | 5,3 |
| <i>A. laidlawii</i> | PG8 | - | + | + | + | + | ± | 86,5 | 9,2 |
| <i>A. modicum</i> | PG49 | - | + | + | + | + | ± | 86,5 | 13 |
| <i>A. oculi</i> | 19-L | - | + | + | + | + | ± | 85 | 7,7 |
| <i>A. parvum</i> | H23M | - | + | + | + | + | ± | 85 | 10,1 |
| <i>Mesoplasma florum</i> | L1 | - | + | + | + | + | + | 86 | 7,1 |
| <i>Mycoplasma (M.) agalactiae</i> | PG2 | + | + | + | + | + | + | 85,5 | 12,2 |
| <i>M. alkalescens</i> | PG51 | + | + | + | + | + | + | 86 | 10,1 |
| <i>M. arginini</i> | G230 | + | + | + | + | + | + | 86 | 42,4 |
| <i>M. auris</i> | CIP 105677 | + | + | + | + | + | + | 86 | 45,5 |
| <i>M. bovigenitalium</i> | PG11 | - | + | + | + | + | + | 86 | 6,4 |
| <i>M. bovirhinis</i> | PG43 | + | + | + | + | + | + | 87 | 15,3 |
| <i>M. bovis</i> | Donneta PG45 | - | + | + | + | + | + | 86 | 6,0 |
| <i>M. bovoculi</i> | M165/69 | - | + | + | + | + | + | 85,5 | 7,7 |
| <i>M. canadense</i> | 275C | - | + | - | + | + | + | 86 | 4,6 |
| <i>M. capricolum subsp. capricolum</i> | kid | + | + | + | + | + | + | 87 | 15,4 |
| <i>M. capricolum subsp. capripneumoniae</i> | F38 | - | + | + | + | + | + | 86,5 | 7,8 |
| <i>M. caviae</i> | G122 | - | + | + | + | + | + | 86 | 7,1 |
| <i>M. columbinum</i> | MMP-1 | + | + | + | + | + | + | 85,5 | 150,3 |
| <i>M. columbinasale</i> | 694 | + | + | + | + | + | + | 85,5 | 200,8 |
| <i>M. columborale</i> | MMP-4 | + | + | + | + | + | + | 86,5 | 243,1 |
| <i>M. cottewii</i> | VIS | + | + | + | + | + | + | 87 | 17,4 |
| <i>M. fermentans</i> | A918 C1 | + | + | + | + | + | + | 86 | 30,4 |
| <i>M. flocculare</i> | Ms42 | - | + | + | + | + | + | 86,5 | 6,3 |
| <i>M. gallinaceum</i> | DD | - | + | + | + | + | + | 86 | 6,8 |
| <i>M. gallinarum</i> | PG16 | - | + | + | + | + | + | 86 | 7,4 |
| <i>M. gallisepticum</i> | PG31 | + | + | + | + | + | + | 86 | 11,6 |
| <i>M. gallopavonis</i> | WP1 | - | + | - | - | - | + | 86,5 | 2,1 |
| <i>M. hominis</i> | PG21 | + | + | + | + | + | + | 86,5 | 12,2 |

Capítulo II: Estudio metodológico

| | | | | | | | | | |
|------------------------------------|---------------|---|---|---|---|---|---|------|------|
| <i>M. hyopharyngis</i> | H3-6B | + | + | + | + | + | + | 85,5 | 12,3 |
| <i>M. hyopneumoniae</i> | Ms42 | - | + | + | + | + | + | 86,5 | 9,3 |
| <i>M. hyorhinis</i> | BTS-7 | - | + | + | + | + | + | 86,5 | 7,9 |
| <i>M. hyosynoviae</i> | S16 | - | + | + | + | + | + | 86 | 5,6 |
| <i>M. imitans</i> | 4229 | + | + | + | + | + | + | 86,5 | 9,1 |
| <i>M. iners</i> | PG30 | + | + | + | + | + | + | 85,5 | 11,7 |
| <i>M. iowae</i> | 695 | + | + | + | + | + | + | 85 | 95,5 |
| <i>M. leachii</i> | PG 50 | + | + | + | + | + | + | 86 | 13,2 |
| <i>M. lipofaciens</i> | ML64 | + | + | + | + | + | + | 86 | 6,9 |
| <i>M. maculosum</i> | PG 15 | - | + | + | + | + | + | 86 | 8,2 |
| <i>M. meleagridis</i> | 17529 | - | + | + | + | + | + | 86 | 7,7 |
| <i>M. mycoides subsp. capri</i> | Y-GOAT | + | + | + | + | + | + | 87 | 11 |
| <i>M. mycoides subsp. mycoides</i> | SC PG1 | + | + | + | + | + | + | 87 | 14 |
| <i>M. neophronis</i> | G.A. | + | + | + | + | + | + | 86 | 10 |
| <i>M. opalescens</i> | MH5408 | + | + | + | + | + | + | 86 | 32,9 |
| <i>M. phocicerebrale</i> | D'049 | + | + | + | + | + | + | 86 | 33,6 |
| <i>M. phocidae</i> | 105 | + | + | + | + | + | + | 86 | 19,1 |
| <i>M. phocirhinis</i> | DG52 | + | + | + | + | + | + | 86 | 19,5 |
| <i>M. sp Phocoena</i> | C-269 | + | + | + | + | + | + | 86,5 | 12,8 |
| <i>M. pneumoniae</i> | FH M III | + | + | + | + | + | + | 86 | 14,9 |
| <i>M. pullorum</i> | CKK | + | + | + | + | + | + | 86 | 15 |
| <i>M. putrefaciens</i> | KS1 | + | + | + | + | + | + | 87 | 22,1 |
| <i>M. spumans</i> | PG13 | + | + | + | + | + | + | 86 | 10,8 |
| <i>M. sualvi</i> | Mayfield B | + | + | + | + | + | + | 86 | 17,7 |
| <i>M. synoviae</i> | WVU 1853 | - | + | + | + | + | + | 84,5 | 7,6 |
| <i>M. verecundum</i> | 107 | - | + | + | + | + | + | 86 | 6,7 |
| <i>M. wenyonii</i> | Massachusetts | + | + | + | + | + | + | 84,5 | 39,9 |
| <i>M. yeatsii</i> | GIH | + | + | + | + | + | + | 87 | 11 |
| <i>M. zalophi</i> | CSL 4296 | + | + | + | + | + | + | 86 | 9,8 |
| <i>M. zalophidermidis</i> | 4779 | + | + | + | + | + | + | 86 | 15,3 |
| <i>Spiroplasma spp.</i> | | + | + | + | + | + | + | 87 | 34,3 |
| <i>Ureaplasma urealyticum</i> | 960 | + | + | - | + | + | + | 85 | 20,3 |

^a Ver Tabla II-3

^b Temperatura de fusión obtenida en la PCR a tiempo real utilizando el par de cebadores de Van Kuppeveld y colaboradores (1992).

+: Amplificación de producto positiva - : Amplificación de producto negativa

±: Amplificación de más de un fragmento de ADN.

Tabla II-2: Especies de bacterias no-mollicutes utilizadas en la comparación de seis pares de cebadores de PCR's. Se muestra la detección de su ADN por cada protocolo de PCR, temperatura de fusión (°C) de la PCR a tiempo real empleando el par de cebadores N° 4 y 5 y la concentración de ADN de la especie analizada.

| Bacterias no-mollicutes | Cepa | PCR's^a | | | | | | Temperatura de fusión (°C)^b | Concentración de ADN (ng/μl) |
|---|--------------|--------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|---|-------------------------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | | |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | 2208 | - | + | - | - | - | + | 82 | 11,1 |
| <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> | M62 | + | + | - | - | + | ± | 82,5 | 35,8 |
| <i>Aeromonas</i> spp. | | + | + | + | - | - | ± | 82,5 | nd |
| <i>Bacillus cereus</i> | ATCC 11778 | + | + | + | - | - | ± | 82,5 | 24 |
| <i>Clostridium</i> spp. | | - | + | - | - | - | ± | 82 | 20,4 |
| <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> | a- P15 | + | + | + | - | - | + | 82 | 20,7 |
| <i>Escherichia coli</i> | ATCC 25922 | - | - | - | - | - | ± | 82 | 20,3 |
| <i>Fusobacterium</i> spp. | | + | + | + | + | + | ± | 82 | 32,3 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> | 4976 | + | + | + | - | - | + | 82,5 | 520,1 |
| <i>Lactococcus garvieae</i> | 8831 | + | + | + | - | - | + | 82,5 | 400,3 |
| <i>Mycobacterium avium</i> sp <i>avium</i> | CHICKEN AHT1 | + | + | + | - | - | + | 82,5 | 182,9 |
| <i>Mycobacterium avium</i> sp <i>paratuberculosis</i> | JC31 | ± | + | + | - | - | + | 83 | 90,4 |
| <i>Photobacterium damsela</i> e subsp. <i>piscicida</i> | 94/99 | + | + | + | - | + | ± | 82,5 | 31,6 |
| <i>Photobacterium damsela</i> e subsp. <i>piscicida</i> | C2 | + | + | + | - | + | ± | 82,5 | 41,5 |
| <i>Photobacterium damsela</i> e subsp. <i>piscicida</i> | pp3 | + | + | + | - | + | ± | 82,5 | 55,7 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC 27853 | + | + | + | - | - | + | 82 | 285,5 |
| <i>Salmonella enterica</i> sv <i>enteridis</i> | ATCC 13076 | + | - | - | - | - | ± | 82,5 | 27,8 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 33591 | + | + | + | - | - | ± | 82 | 9,3 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | ATCC 12386 | + | + | + | - | + | + | 82,5 | 29,5 |
| <i>Streptococcus suis</i> | 735 | + | + | + | - | + | + | 82,5 | 41,9 |
| <i>Vibrio anguillarum</i> | Baumann 114 | - | + | + | - | + | ± | 82,5 | 18,3 |

^a Ver Tabla II-3

^b Temperatura de fusión obtenida en la PCR a tiempo real utilizando el par de cebadores de Van Kuppeveld y colaboradores (1992).

+: Amplificación de producto positiva -: Amplificación de producto negativa
±: Amplificación de más de un fragmento de ADN.

II.2.3 CONFIRMACIÓN DE LA IDENTIDAD DEL ADN

Para verificar la identidad y pureza de los mollicutes fue analizada la secuencia de la región localizada entre los genes ARNr 16S y 23S (ISR) de todas las especies utilizadas (Ramírez et al., 2008). La identidad de las especies del género *Acholeplasma* fue determinada utilizando la secuencia de un fragmento del gen ARNr 16S con los cebadores indicados por Spargser y colaboradores (2002). El ADN de las bacterias *Actinobacter baumannii*, *Aeromonas* spp., *Clostridium* spp., *Fusobacterium* spp. y *Erysipelothrix rhusiopathiae* fue confirmado por el análisis de la secuencia de su ISR. Las cepas comerciales de *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* sv *enteridis*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* fueron obtenidas de Oxoid (Thermo Scientific).

La secuenciación fue llevada a cabo por la empresa MacroGen Europe (Holanda) con un modelo de secuenciador de Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer. Para la lectura de los cromatogramas (formato ABI) se utilizó el programa informático FinchTV versión 1.3.1 (Geospiza, Inc.). Programa que también se empleó para exportar las secuencias de dichos cromatogramas (formato SEQ). El programa Gene Runner 3.05 (Hasting Software Inc.) se utilizó para alinear las secuencias de ida y de vuelta de cada producto, así como en el caso de necesitar más de un producto para completar la secuenciación de los genes, obteniendo una secuencia consenso. Para comparar secuencias se utilizó el programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Ibis Pharmaceuticals, Inc.) y para calcular los porcentajes de similitudes entre ellas. Empleándose también para obtener las imágenes de las comparaciones entre secuencias. La secuencia de nucleótidos obtenida, comparada con la base de datos GenBank mediante la aplicación *Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn)* (Atschul et al., 1997).

II.2.4 COMPARACIÓN DE SEIS PARES DE CEBADORES (PCR'S).

Fueron comparados seis pares de cebadores con sus respectivos protocolos de PCR, específicos para la detección de microorganismos de la Clase *Mollicutes* o Género *Mycoplasma* (**Tabla II-3**). En el caso de los cebadores descritos por McAuliffe y colaboradores (2005), la visualización de los productos de la PCR se hizo en gel de agarosa en vez de en gel con gradiente de desnaturalización. Fue utilizado el ADN genómico de todas las especies listadas en las **Tablas II-1** y **II-2**. El sistema de reacción (25 μ l) usando “beads” *illustraTMPureTaqTM Ready-to-GoTM PCR* (GE Healthcare) consistió en 1 μ l (20 μ M) de cada cebador (*forward* y *reverse*), 3 μ l de ADN genómico y agua *PCR-grade* (Sigma). El protocolo de cada PCR fue realizado en un termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf) y repetido al menos tres veces. El control positivo en cada prueba fue el ADN de *M. mycoides* subsp. *capri* (Y-GOAT), *mientras que el control negativo fue realizado colocando agua en lugar del ADN genómico. Cada PCR fue repetida al menos dos veces utilizando otro termociclador. Para confirmar la* amplificación de producto por cada par de cebadores se realizó una electroforesis (100 V por 50 min) en un gel de agarosa (1% p/v en tampón TAE 1x) teñido con Gel-Red (Biotium) (0,025 μ l/ml) para, posteriormente, visualizarlo en un transiluminador (Bio-Rad). Fue necesario utilizar un gel al 3% de agarosa para visualizar el producto de pequeño tamaño amplificado por el par de cebadores de Hotzel y colaboradores (2003). Para estimar el tamaño de los productos amplificados se recurrió al marcador molecular Amplisize 2000-50 pb (Bio-Rad).

II.2.5 PRUEBAS DE ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD DE LAS PCR'S

II.2.5.1 Pruebas de especificidad

En las pruebas de especificidad fueron utilizadas las bacterias no-mollicutes listadas en la **Tabla II-2**.

Tabla II-3: Pares de cebadores comparados, nombre y secuencia de los cebadores, tamaño del amplicón amplificado y su referencia.

| PCR | Cebadores | Secuencia ^a | Amplicón (pb) | Referencia |
|-----|------------|---|---------------|--|
| 1 | Myc23F1729 | 5' CTAAGGTAGCGAGWDACTATAG 3' | 102-110 | Hotzel et al. (2003) |
| | Myc23R1843 | 5' CCCCWCWTSYTTYACTGMGGC 3' | | |
| 2 | MW28 | 5' CCAGACTCCTACGGGAGGCA 3' | 580 | Sperser et al. (2002) |
| | MW29 | 5' TCGAGCATACTACTCAGGC 3' | | |
| 3 | GC341F | 5'CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGCA | 340 | McAuliffe et al. (2005) |
| | R543 | CGGGGGCCCTACGGGAGGCAGCAG 3' 5' ACCTATGTATTACCGC 3' | | |
| 4 | GPO3 | 5' GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT 3' | 270 | Van Kuppeveld et al. (1992) ^b |
| | MGSO | 5' TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC 3' | | |
| 5 | GPO3F | 5' TGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC 3' | 270 | Botes et al. (2005) |
| | MGSO | 5' TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC 3' | | |
| 6 | 16S+C | 5' CGTTCTCGGGTCTTGTACAC 3' | 400-600 | Ramírez et al. (2008) |
| | 23S-B | 5' CGCAGGTTTGCACGTCCTTCATCG 3' | | |

^a Todos los pares de cebadores están basados en el gen ARNr 16S, excepto el de Hotzel y colaboradores (2003) que está basado en el gen ARNr 23S y el de Ramírez y colaboradores (2008), basado en la región entre los genes ARNr 16S y 23S (ISR).

^b Corrección del autor: *Appl Environ Microbiol*, 59:655, 1993.

II.2.5.2 Pruebas de sensibilidad

La sensibilidad fue medida de dos formas: empleando un panel de especies de mollicutes y también utilizando una serie de diluciones de ADN, hasta 10^{-10} , provenientes de cultivos seriados de *M. mycoides* subsp. *capri* (Y-GOAT) (MMC) y *Acholeplasma laidlawii* (PG8) (ACO). Fue contado el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por 100 µl de cada cultivo (Bradbury, 1977). En paralelo, fue extraído el ADN y la PCR fue llevada a cabo con cada dilución.

La especificidad, sensibilidad y valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN) para cada PCR fueron calculadas (nivel de confianza de 95%) usando el software Win-Epi 2.0 (De Blas, 2006), versión online del software Win Episcope 2.0 (Thrusfield et al., 2001). Como este tipo de prueba es utilizado sobre todo cuando se verifica la eficacia para detectar una enfermedad, las definiciones utilizadas son: VPP: la probabilidad de tener la enfermedad si el resultado de la prueba diagnóstica es positivo; VPN: la probabilidad de no tener la enfermedad si el resultado de la prueba diagnóstica es negativo (Greiner y Gardner, 2000). Estos valores fueron interpretados en nuestro

estudio como “la probabilidad de detectar un mollicute cuando la bacteria es realmente un mollicute” y “la probabilidad de indicar que la bacteria detectada no es un mollicute cuando realmente no lo es”, respectivamente.

II.2.6 PCR A TIEMPO REAL

Los cebadores y protocolo descritos por Van Kuppeveld y colaboradores (1992) fueron utilizados en una PCR a tiempo real. El sistema de reacción (25 µl) consistió en 12,5 µl de *iQ SYBR Green Supermix* (Bio-Rad), 1 µl (20 µM) de cada cebador (*forward* y *reverse*), 5 µl de ADN genómico y agua *PCR-grade* (Sigma). El protocolo de PCR fue realizado en un termociclador *MyiQi Cyclor Detection System* (Bio-Rad); y el análisis, con su propio *software MyiQ system 1.0.410*. Los controles positivos y negativos fueron los mismos que en las PCR's convencionales. Fue analizada la temperatura de fusión de la curva de disociación de cada muestra. Fue calculada su especificidad, sensibilidad y valores predictivos como fue explicado anteriormente.

Adicionalmente, y con fines comparativos, también fue realizada una PCR a tiempo real empleando los cebadores descritos por Botes y colaboradores (2005), que corresponden a una modificación de los indicados por Van Kuppeveld y colaboradores (1992).

II.3 RESULTADOS

II.3.1 ORGANISMOS Y ADN

Todos los mollicutes y bacterias no-mollicutes crecieron bien en las condiciones de cultivo indicadas. La extracción de ADN fue satisfactoria y su concentración es mostrada en las **Tablas II-1** y **II-2**. Al comparar las secuencias de cada especie (ISR o fragmento del gen ARNr 16S) con la base de datos GenBank se obtuvieron valores de similitud iguales o superiores a 99%, confirmando así su identidad.

Debido a que el ADN de *Mycoplasma gallopavonis* no amplificó ningún producto visible con la mayoría de los pares de cebadores empleados, se le realizó una prueba de su integridad, dando como resultado una concentración aproximada menor de 1,5 ng/ μ mol.

II.3.2 ESPECIFICIDAD

II.3.2.1 *Mollicutes*

La comparación de las seis PCR's es mostrada en la **Tabla II-1**. El par de cebadores de Hotzel y colaboradores (2003) (**1**) amplificaron el producto esperado en 38 (62,3%) de los 61 mollicutes analizados, mientras que el par de cebadores de Spargser y colaboradores (2002) (**2**) lo hizo en todos (100%). Los pares de McAuliffe y colaboradores (2005) (**3**) detectaron 58 (95,1%), mientras que los de Van Kuppeveld y colaboradores (1992) (**4**) y Botes y colaboradores (2005) (**5**), 60 (98,4%) de los mollicutes. La PCR de ISR siempre amplificó a lo menos un producto en todas las muestras analizadas.

El uso de los cebadores de Van Kuppeveld y colaboradores (1992) o aquellos descritos por Botes y colaboradores (2005) en la PCR a tiempo real mostró valores de fluorescencia y curvas de disociación para todas las muestras, incluyendo el control negativo, sin embargo, la temperatura de fusión de todos los mollicutes estuvo en el

rango de 84,5 a 87 °C (**Figura II-1**). Esta temperatura de fusión fue observada en el 100% de los mollicutes utilizados.

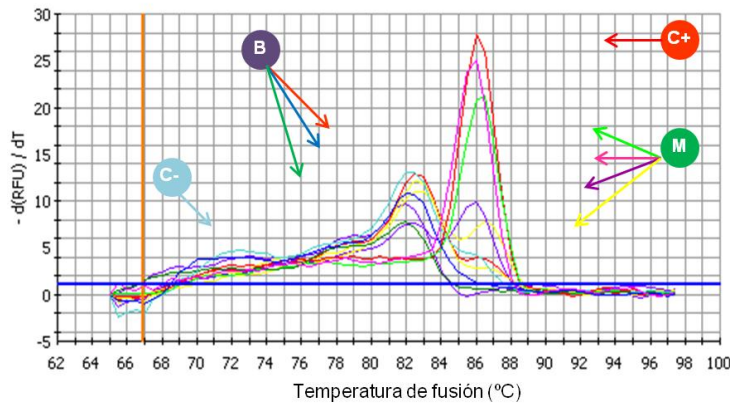


Figura II-1: Curva de disociación obtenida por PCR a tiempo real empleando cebadores específicos para la detección de la Clase *Mollicutes* basados en un fragmento del gen ARNr 16S (Van Kuppeveld et al., 1992). Las flechas indican las curvas de su mismo color, siendo: **C+**: control positivo [*M. mycoides* subsp. capri (Y-GOAT)]; **C-**: control negativo (agua); **M+**: ADN de mollicutes; **B**: ADN de bacterias no-mollicutes.

II.3.2.2 Bacterias no-mollicutes

De las 21 bacterias no-mollicutes analizadas 19 (90,5%) amplificaron al menos un producto al utilizar el par de cebadores de Spergser y colaboradores (2002) (**2**) (**Figura II-2**); así como 17 (81 %), 16 (76,2%), 8 (38,1%) y 1 (4,8%) con los de Hotzel y colaboradores (2005) (**1**), McAuliffe y colaboradores (2003) (**3**), Botes y colaboradores (2005) (**5**) y Van Kuppeveld y colaboradores (1992) (**4**), respectivamente. La PCR de la ISR amplificó todas las muestras de ADN de estas bacterias, resultando en la visualización de una sola o más bandas de acuerdo a la especie (**Figura II-3**). La PCR a tiempo real mostró curvas de disociación para todas las bacterias, pero con temperaturas

Capítulo II: Estudio metodológico

de fusión siempre inferiores a la de mollicutes (84,5 °C), igual o menor de 83 °C, siendo la temperatura de fusión más prevalente la de 82 °C. Esta misma temperatura fue la que presentaron los controles negativos.

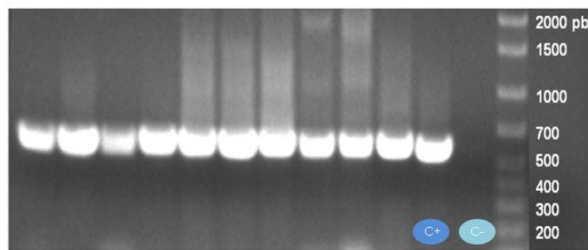


Figura II-2: Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos de PCR del fragmento del gen ARNr 16S con los cebadores indicados por Spergser y colaboradores (2002). Se muestra un gel con productos de mollicutes y bacterias no-mollicutes. El producto amplificado es de aproximadamente 580 pb. **C+**: control positivo [*M. mycoides* subsp. *capri* (Y-GOAT)]; **C-**: control negativo (agua).

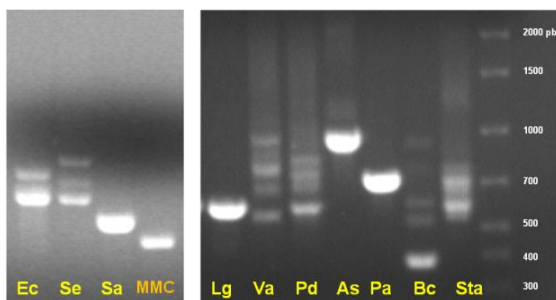


Figura II-3: Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos de PCR de la ISR de bacterias no-mollicutes y *M. mycoides* subsp. *capri* (Y-GOAT) (**MMC**) utilizando los cebadores indicados por Ramírez y colaboradores (2008). **Ec:** *Escherichia coli*; **Se:** *Salmonella enterica* sv *enteridis*; **Sa:** *Streptococcus agalactiae*; **Lg:** *Lactococcus garvieae* 8831; **Va:** *Vibrio anguillarum*; **Pd:** *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*; **As:** *Aeromonas* spp. ; **Pa:** *Pseudomonas aeruginosa*; **Bc:** *Bacillus cereus*; **Sta:** *Staphylococcus aureus*. El marcador molecular es válido para ambos gels.

II.3.3 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

El conteo de UFC de ambas especies utilizadas en las pruebas de sensibilidad: *M. mycoides* subsp. *capri* (Y-GOAT) (MMC) y *Acholeplasma laidlawii* (PG8) (ACO) y su cantidad de ADN son mostrados en la **Tabla II-4**.

Tabla II-4: Diluciones, Unidades Formadoras de Colonias (UFC) y concentración de ADN de *M. mycoides* subsp. *capri* (Y-GOAT) (MMC) y *Acholeplasma laidlawii* (PG8) (ACO) utilizadas para las pruebas de sensibilidad de los seis pares de cebadores comparados.

| Dilución ^a | MMC | | ACO | |
|-----------------------|------------------|---------|------------|--------|
| | UFC/100 µl | ADN/µl | UFC/100 µl | ADN/µl |
| 0 | DNC ^b | 151 ηg | DNC | 210 ηg |
| 10 ⁻¹ | DNC | 15,1 ηg | DNC | 21 ηg |
| 10 ⁻² | DNC | 1,51 ηg | DNC | 2,1 ηg |
| 10 ⁻³ | 2.914 | 151 ρg | DNC | 210 ρg |
| 10 ⁻⁴ | 390 | 15,1 ρg | 3.962 | 21 ρg |
| 10 ⁻⁵ | 41 | 1,51 ρg | 427 | 2,1 ρg |
| 10 ⁻⁶ | 14 | 151 fg | 30 | 210 fg |
| 10 ⁻⁷ | 1 | 15,1 fg | 5 | 21 fg |
| 10 ⁻⁸ | 0 | 1,51 fg | 0 | 2,1 fg |
| 10 ⁻⁹ | 0 | | 0 | |
| 10 ⁻¹⁰ | 0 | | 0 | |

^a Sólo el ADN proveniente del cultivo sin diluir fue cuantificado .

^b DNC= Demasiado numeroso para ser contado.

El par de cebadores de Spergser y colaboradores (2002) fue el más sensible (**Tabla II-5**), pudiendo detectar el ADN de ambas especies hasta en la dilución de 10⁻⁵. Por el contrario, el par de cebadores indicado por Hotzel y colaboradores (2003) mostró la menor sensibilidad, detectando ADN de MMC sólo hasta la dilución 10⁻¹ y no amplificando ningún producto en ninguna muestra de ACO.

Capítulo II: Estudio metodológico

La sensibilidad de la PCR a tiempo real aumentó en una dilución si en vez de utilizar los cebadores de Van Kuppeveld y colaboradores (1992) se utilizaban los de Botes y colaboradores (2005), de 10^{-4} a 10^{-5} .

Tabla II-5: Límite de las diluciones ADN de *M. mycoides* subsp. *capri* (Y-GOAT) (MMC) y *Acholeplasma laidlawii* (PG8) (ACO) detectado por los seis pares de cebadores comparados y en dos PCR's a tiempo real.

| Especies | PCR's ^a | | | | | | A tiempo real ^b | |
|----------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------------------------|-----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 4' | 5' |
| | MMC | 10^{-1} | 10^{-5} | 10^{-2} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-3} | 10^{-4} |
| ACO | - | 10^{-5} | 10^{-2} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-3} | 10^{-4} | 10^{-5} |

^a Ver Tabla II-3

^b Las PCR's a tiempo real fueron realizadas usando los pares de cebadores indicados por Van Kuppeveld y colaboradores (1992) (4') y Botes y colaboradores (2005) (5').

-: Amplificación de producto negativa

II.3.4 CÁLCULO DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

La especificidad, sensibilidad y valores predictivos para cada PCR son mostrados en la **Tabla II-6**. Hay que considerar que fueron utilizados todos los resultados, incluyendo aquellos de mollicutes que fueron negativos debido a la poca cantidad de ADN disponible y la baja sensibilidad de los cebadores. La pareja de cebadores indicada por Spergser y colaboradores (2002) (2) fue la más sensible (100%) y menos específica (9,5%), mientras que la indicada por Van Kuppeveld y colaboradores (1992) (4) alcanzó valores altos en ambos parámetros con 98,4 y 95,2% en sensibilidad y especificidad, respectivamente. Los cebadores indicados por Hoztel y colaboradores

(2003) (1) mostraron valores bajos en ambos parámetros, siendo el menos sensible (62,3%) de todos y con una especificidad de sólo un 19%. Los cebadores indicados por McAuliffe y colaboradores (2005) (3) y Botes y colaboradores (2005) (5) mostraron valores altos de sensibilidad (95,1 y 98,4%, respectivamente), sin embargo mostraron valores relativamente bajos de especificidad, 23,8 y 61,9%, respectivamente. Al comparar el desempeño de los cebadores Van Kuppeveld y colaboradores (1992) (4') y Botes y colaboradores (2005) (5') en la PCR a tiempo real se aprecia que fueron más sensibles y específicos que cuando fueron utilizados en PCR convencional. Ambas parejas muestran valores altos de especificidad, de 100%, para ambas parejas y de sensibilidad, 100 y 95,2%, respectivamente; con valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN) de 98,4 y 88,2 y 95,2 y 92,9, para cada uno.

Tabla II-6: Especificidad, sensibilidad y valores predictivos para cada PCR utilizada para la detección de mollicutes (nivel de confianza de 95%) empleando el *software* Win-Epi 2.0 (De Blas, 2006), versión *online* del *software* Win Episcope 2.0 (Thrusfield et al., 2001).

| Parámetros ¹ | PCR's ² | | | | | | | | | | A tiempo real ³ | | | |
|-------------------------|--------------------|------|-------------|------|-------------|------|-------------|-----|-------------|------|----------------------------|-----|-------------|-----|
| | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | | 4' | | 5' | |
| | M | B | M | B | M | B | M | B | M | B | M | B | M | B |
| Prueba + | 34 | 17 | 61 | 19 | 58 | 16 | 60 | 1 | 60 | 8 | 61 | 0 | 61 | 1 |
| Prueba - | 23 | 4 | 0 | 2 | 3 | 5 | 1 | 20 | 1 | 13 | 0 | 21 | 0 | 20 |
| SEN (%) | 62,3 | | 100 | | 95,1 | | 98,4 | | 98,4 | | 100 | | 100 | |
| | 50,1 | 74,5 | 100 | 100 | 89,7 | 100 | 95,2 | 100 | 95,2 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| SPE (%) | 19 | | 9,5 | | 23,8 | | 95,2 | | 61,9 | | 100 | | 95,2 | |
| | 2,3 | 35,8 | 0 | 22,1 | 5,6 | 42 | 86,1 | 100 | 41,1 | 82,7 | 100 | 100 | 86,1 | 100 |
| VPP (%) | 69,1 | | 76,3 | | 78,4 | | 98,4 | | 88,2 | | 100 | | 98,4 | |
| | 56,9 | 81,3 | 66,9 | 85,6 | 69 | 87,8 | 95,2 | 100 | 80,6 | 95,9 | 100 | 100 | 95,3 | 100 |
| VPN (%) | 14,8 | | 100 | | 62,5 | | 95,2 | | 92,9 | | 100 | | 100 | |
| | 1,4 | 28,2 | 100 | 100 | 29 | 96 | 86,1 | 100 | 79,4 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

¹ **M:** Mollicutes (Nº total:61); **B:** Bacterias no-mollicutes (Nº total:21); **SEN:** Sensibilidad; **SPE:** Especificidad; **VPP:** Valor Predictivo Positivo; **VPN:** Valor Predictivo Negativo.

² Ver Tabla II-3.

³ PCR a tiempo real utilizando los cebadores indicados por Van Kuppeveld y colaboradores (1992) (4') y Botes y colaboradores (5').

II.4 DISCUSIÓN

Considerando que el objetivo de la presente tesis era la detección de mollicutes en organismos marinos en una gran cantidad estimada de muestras, necesitábamos encontrar una técnica que pudiera mostrarnos rápidamente si había ADN de mollicutes en las muestras obtenidas. De esta manera podría concentrarse el trabajo en aquellas positivas y descartar las sospechosas que finalmente no tuvieran ningún tipo de mollicutes. En este sentido, el uso de la PCR se ha mostrado rápido y muy eficiente en la detección de mollicutes, ahorrando técnicas de cultivo que anteriormente eran imprescindibles para detectar e identificar estas bacterias, pudiendo detectar incluso ADN de microorganismos no viables (Hopert et al., 1993; Eldering et al., 2004; Lobo et al., 2006; Nicholas et al., 2008; Zhi et al., 2010).

Hay que destacar que para validar el uso de nuevos cebadores y protocolos de PCR para la detección de algún microorganismo como un método estándar y oficial es necesario realizar diversas pruebas de sensibilidad y especificidad bajo determinadas directrices establecidas por las instituciones responsables de análisis microbiológicos, como la Farmacopea Europea (2011). En nuestro caso, el propósito fue solamente comparar cebadores y PCR's ya descritos y escoger el más adecuado para nuestro estudio final con mollicutes de organismos acuáticos, por lo que las pruebas realizadas fueron dirigidas a nuestros propósitos y no a validar algún método estándar en concreto.

Un último aspecto a considerar es que existen muchos compuestos que pueden inhibir alguna fase de una PCR (convencional o a tiempo real), uniéndose a la enzima (Taq Polimerasa), al propio ADN o interactuando con la enzima en la fase de extensión. Entre los inhibidores más comunes se encuentran algunos compuestos orgánicos como sales biliares, urea, fenol, etanol, polisacáridos, dodecilsulfato sódico SDS, ácidos húmicos, entre otros (Opel et al., 2010; Schrader et al., 2012). No realizamos ningún tipo de prueba para estos compuestos, debido a que el ADN utilizado proviene de cultivos

puros y ha sido extraído eficientemente descartando todas las moléculas diferentes a ADN.

II.4.1 CEBADORES

Cuando se selecciona un par de cebadores para la detección de alguna especie o grupo específico es necesario considerar dos parámetros muy importantes: su sensibilidad, esto es, la capacidad que tiene de amplificar una cantidad de copias de ADN adecuada para ser analizada partiendo de una cierta concentración de ADN genómico. A medida que la amplificación requiere más ADN para tales copias menos sensible será el par de cebadores. He y colaboradores (1994) comprobaron que la sensibilidad de una PCR está directamente relacionada con la “calidad” de los cebadores empleados. En su estudio buscaban los cebadores más adecuados para la detección de *Borrelia burgdorferi*, mycobacteria y *Bordetella pertussis*, y observaron que algunos pares de cebadores podían ser 100 ó hasta 1000 veces más sensibles que otros, no importando la cantidad de ADN que utilizaban. También observaron que no existe una manera teórica de predecir esto, sino que la comprobación es sólo a través de ensayos prácticos. Hay estudios que muestran que emplear una PCR anidada permitiría aumentar la sensibilidad y detectar pequeñas cantidades de ADN (Nicholas et al., 2008).

El segundo parámetro importante es la especificidad del par de cebadores, o sea, la capacidad de detectar sólo aquel grupo para el cual fue diseñado y que no amplifique productos de otras especies/grupos que representen “falsos positivos”. Actualmente hay varios programas (Ej. Oligo7 y PrimerPremier) o aplicaciones *online* (Ej. <http://simgene.com/Primer3>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> y <http://molbiol-tools.ca/PCR.htm>) que sirven para diseñar cebadores, considerando que “encajen” (sean compatibles) con las secuencias buscadas, evitando la coincidencia con otras no deseadas. Sin embargo, siempre es necesario hacer ensayos prácticos para verificar su especificidad.

En el presente estudio fueron considerados ambos parámetros en la elección del mejor par de cebadores para la detección de microorganismos de la Clase *Mollicutes*, por lo se utilizó una gran variedad de especies pertenecientes a ella así como de bacterias no-mollicutes para probar cada par de cebadores.

En la literatura se puede encontrar varios estudios indicando pares de cebadores para la detección de mollicutes, inclusive, actualmente hay muchas pruebas con *kits* comerciales disponibles, utilizadas, sobre todo, para la detección de mollicutes en cultivos celulares o productos biofarmacéuticos, que frecuentemente son contaminados por estas bacterias (Hopert et al., 1993; Eldering et al., 2004; Lobo et al., 2006; Zhi et al., 2010). La Farmacopea Europea ha validado la utilización de esta técnica para este uso (Edginton, 2000). Dentro de todos aquellos cebadores encontramos algunos que llamaron nuestra atención: Los indicados por Hotzel y colaboradores (2003) que a través del análisis de un fragmento de aproximadamente 102-110 pb del gen ribosómico ARNr 23S conseguía detectar mollicutes. La mayoría de los cebadores utilizados están diseñados para amplificar fragmentos del gen ARNr 16S por lo que probar unos que consideraran otra parte del genoma nos pareció interesante. Otro par de cebadores fue el descrito por Spergser y colaboradores (2002) que a través de un fragmento de 580 pb del gen ARNr 16S podía teóricamente detectar mollicutes con una muy buena sensibilidad. El tercer par fue el descrito por McAuliffe y colaboradores (2005) y amplifica un fragmento de 340 pb del mismo gen y ha sido utilizado en nuestro grupo para la realización de la técnica de *DGGE* (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*). En ella se realiza una electroforesis utilizando un gel con gradiente de desnaturalización que permite la visualización de bandas a diferentes alturas de acuerdo a la secuencia amplificada, incluso si son diferentes una de otra por tan sólo un par de bases. Este par de cebadores y esta técnica fueron utilizados exitosamente por Suárez-Pérez (2012) en un estudio con mollicutes de aves silvestres, en el que consiguió diferenciar especies muy próximas. El cuarto par elegido fue el descrito por Van Kuppeveld y colaboradores (1992) el cual comenzó a ser utilizado en nuestro laboratorio en la detección de mollicutes en ovejas y mostró buenos resultados (Relancio, 2010), además, de haber

sido utilizado con éxito en otros estudios (Lobo et al., 2006; Kilic et al., 2013). Revisando la bibliografía encontramos que Botes y colaboradores (2005), trabajando en la detección de mollicutes en avestruces, habían aumentado la sensibilidad de estos cebadores, cambiando la posición en dos pb del cebador *forward*, por lo que también nos pareció importante compararlo con los anteriores.

Por último, el par de cebadores indicado por Ramírez y colaboradores (2008), para la amplificación de la ISR, ha sido utilizado para la identificación y diferenciación de especies de mollicutes (Harasawa, 1996; Tang et al., 2000; Volokhov et al., 2006; Ramírez et al., 2011; Rebelo et al., 2011). Al ser una región que se encuentra entre genes altamente conservados es posible amplificarla en prácticamente cualquier microorganismo utilizando cebadores universales (Rodicio y Mendoza, 2004). En el presente estudio este par de cebadores junto con la secuenciación de su producto fue utilizado para la verificación de la identidad de las cepas trabajadas, como prueba de oro, y, al mismo tiempo, quisimos observar su límite de detección así como su capacidad de amplificar productos de buena calidad para su secuenciación a partir de cualquier mollicute o bacteria diferente.

II.4.2 ESPECIES UTILIZADAS.

Para validar nuestras observaciones fue necesario comprobar si los diferentes cebadores podrían detectar cualquier microorganismo de la Clase *Mollicutes* o si eran útiles solamente para cierto grupo o “cluster” dentro de ella, así como verificar si el ADN de bacterias no-mollicutes podría amplificar algún producto, dándonos un resultado “falso positivo”. Nuestro grupo de investigación tiene más de 20 años trabajando en el área de la micoplasmología y ha tenido la oportunidad durante todo ese tiempo de reunir una colección de especies y cepas de varios mollicutes, producto de su aislamiento en nuestro propio laboratorio o cedidas por otros grupos mediante convenios de cooperación. Todas las especies se encontraban liofilizadas y mantenidas a 4 °C, por lo que hubo que reactivarlas con agua bidestilada estéril y su medio de cultivo correspondiente: PH, SP4-II o Friis, de acuerdo al medio en el que crecían antes de ser

lío-filizadas. Algunas de ellas crecieron sin problemas pero hubo otras que no crecieron, de las que, igualmente, fue extraído ADN. Hay que notar que algunas cepas estaban guardadas desde la década de los '70, tiempo en el que su identificación específica era realizada sólo en base a su perfil bioquímico, antisueros y/o de acuerdo al hospedador y la sintomatología que éste podía manifestar como señal de alguna infección por mollicutes, por lo que fue necesario confirmar su especie. Tal verificación se hizo extrayendo el ADN y secuenciando el producto de PCR de la ISR o el fragmento del gen ARNr 16S como en el caso de los representantes del género *Acholeplasma*. En la mayoría de las especies fue confirmada su identidad original, sin embargo, algunas habían sido identificadas en su momento en forma equivocada o eran mezcla de más de una especie. De las especies puras fueron escogidas las más representativas para el estudio, de tal manera que abarcaran todas las especies dentro de la variedad que presenta la Clase *Mollicutes*, considerando su grupo filogenético según lo descrito por Brown y colaboradores (2010E). Fueron utilizadas especies pertenecientes a cuatro de estos cinco grupos filogenéticos: el grupo *Anaeroplasma*, con representantes del Género *Acholeplasma*; grupo *Spiroplasma*, con representantes del Género *Spiroplasma*, miembros del "cluster" Mycoides y un hemoplasma (*M. wenyonii*); grupo *M. pneumoniae*, con representantes de cuatro "cluster" del Género *Mycoplasma*, así como un *Ureaplasma*; y finalmente, el grupo *M. hominis*, con miembros del Género *Mycoplasma*, pero "clusters" diferentes a los del grupo anterior. El quinto es el grupo *Asteroplasma* con un única especie *Asteroplasma anaerobium*, a la cual no tuvimos acceso. Entre las especies escogidas hubo algunas provenientes de diferentes tipos de hospedadores: aves (ej. *M. gallisepticum* y *M. gallopavonis*), bovinos (ej. *M. bovis* y *M. bovigenitalium*), caprinos (ej. *M. agalactiae* y *M. auris*), cetáceos (*M. sp Phocoena*), cánidos (*M. maculosum*), humanos (ej. *M. hominis* y *M. pneumoniae*), ovinos (ej. *M. arginini* y *M. capricolum*), pinnípedos (ej. *M. phocicerebrale* y *M. phocidae*), porcinos (ej. *M. hyorhinis* y *M. hyopneumoniae*), e, incluso, de plantas (*Mesoplasma florum*).

Debido al lento o nulo crecimiento de algunas cepas, la cantidad de ADN de algunas especies fue muy poca (como *M. gallopavonis* con una concentración menor de

2 ng/μl calculado por nanodrop y menor de 1,5 ng/μl calculado por la integridad del ADN), circunstancia que al comienzo fue un problema, pues la idea principal era evaluar si los cebadores conseguían detectar todas las especies de mollicutes de las que disponíamos, sin embargo, posteriormente esta diferencia de concentraciones de ADN fue una herramienta que nos confirmó la sensibilidad de los cebadores utilizados. El caso de bacterias no-mollicutes fue diferente, ya que empleamos bacterias que crecían muy rápido por lo que disponer de su ADN era relativamente sencillo. Las bacterias escogidas para la pruebas fueron las que usualmente se utilizan cuando se evalúa la especificidad de un par de cebadores: *Bacillus cereus*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica sv enteridis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, todas cepas comerciales. Además, y considerando que trabajaríamos con muestras procedentes del medio acuático, fueron escogidas algunas bacterias marinas (*Photobacterium damsela*, *Aeromonas* spp, *Vibrio anguillarum*, *Fusobacterium* spp.) y otras de agua dulce (dos cepas de *Lactococcus garviae* una patógena de trucha (8831) y otra de anguila (4976)). Adicionalmente, y para aprovechar mucho más este estudio y verificar la especificidad de los cebadores, también se empleó el ADN de dos bacterias patógenas de cerdo que frecuentemente se encuentran asociadas a enfermedades o infecciones provocadas por micoplasmas: *Streptococcus suis* y *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Fablet et al., 2012; Kang et al., 2012); así como otras bacterias que en algún momento aparecieron en muestras de campo y/o contaminaron nuestros cultivos.

II.4.3 MOLLICUTES

Los resultados mostraron que los cebadores que detectaron todas las especies de mollicutes fueron los indicados por Spergser y colaboradores (2002); seguidos por los de Van Kuppeveld y colaboradores (1992) (4) y Botes y colaboradores (2005) (5) que detectaron 60 de los 61 mollicutes utilizados; y por los de McAuliffe y colaboradores (2005) que detectaron 58; finalmente, los cebadores de Hotzel y colaboradores (2003) (1) que detectaron sólo un 62,3% de ellos. Al analizar los resultados de la sensibilidad en los micoplasmas, se percibe que la detección de una especie es debida a la cantidad de

ADN utilizada y no por el cebador en sí. Es claro que cuando su concentración es menor de 10 ng/μl los cebadores de estos últimos autores no consiguen amplificar una cantidad de producto suficiente para ser visualizado en el gel de electroforesis. Se observa también que si la concentración de ADN es de 4,6 ng/μl o inferior, son los cebadores de McAuliffe y colaboradores (2005) los que no consiguen amplificar suficiente producto. Los cebadores de Van Kuppeveld y colaboradores (1992) (4) y Botes y colaboradores (2005) (5) pudieron amplificar producto observable hasta la concentración de 4,6 ng/μl bajo la cual no fue amplificada la cantidad de copias necesaria para visualizar el producto de PCR. La PCR descrita por Spargser y colaboradores (2002), por otra parte, mostró la mayor sensibilidad, al amplificar suficiente producto como para ser visualizado, incluso cuando la concentración de ADN fue tan baja como con una cantidad menor de 2 ng/μl.

Finalmente, los cebadores utilizados para la amplificación de la ISR resultaron en la amplificación de un producto de buena calidad en la mayoría de los mollicutes, dependiendo, eso sí, de la cantidad de ADN utilizada en la PCR. En el caso de *M. gallopavonis* (concentración de ADN menor de 2 ng/μl) fue perceptible un producto en el gel de agarosa, sin embargo, demasiado leve como para ser utilizado para secuenciar su ISR. Nuestras observaciones muestran que concentraciones mayores de 10 ng/μl de ADN darían un número de copias del amplicón adecuadas para ser enviada a secuenciar e identificar su especie. El tamaño de las bandas de la ISR de muchas especies es similar por lo que no es posible identificar sólo a través de su peso molecular la especie. Por otra parte, es importante observar que cuando fue utilizado ADN de algún acholeplasma se visualizaron al menos dos bandas claramente de diferente tamaño. Esto se explica considerando que las especies de este género poseen al menos dos copias de la ISR, teniendo en una de ellas un gen de ARNt, lo que haría que ambas ISR fuesen de diferente tamaño (Nakagama et al., 1992). Un caso similar acontece con *Bacillus subtilis* (Loughney et al., 1982) y *Escherichia coli* (Morgan et al., 1978) las cuales presentan hasta ocho copias de la ISR algunas de las cuales también con genes ARNt insertados.

Estos valores de sensibilidad fueron confirmados en las pruebas utilizando diluciones seriadas del ADN de *M. mycoides* subsp. *capri* (Y-GOAT) y *Acholeplasma laidlawii* (PG8). Los cebadores de Spargser y colaboradores (2002) (2) se mostraron como los más sensibles, mostrando bandas en el gel de electroforesis hasta la dilución 10^{-5} (1,5 y 2,1 pg/ μ l de ADN de MMC y ACO, respectivamente). Los menos sensibles fueron los indicados por Hotzel y colaboradores (2003) (1) que detectaron sólo el micoplasma a la dilución 10^{-1} (15,5 ng/ μ l de ADN) y no amplificando ningún producto de acholeplasma. La sensibilidad de los pares McAuliffe y colaboradores (2005) (3) y los de Van Kuppeveld y colaboradores (1992) (4) fueron iguales, detectando hasta concentraciones de ADN de 1,5 y 2,5 ng/ μ l de ADN de MMC y ACO, respectivamente. Por otra parte, hay que destacar que al comparar los cebadores de este último autor con los de Botes y colaboradores (2005) (5) se aprecia un aumento de sensibilidad de estos últimos, consiguiendo detectar hasta 151 pg/ μ l de ADN. Hay que recordar que fue por esta razón que este autor modificó el cebador *de ida (forward)* propuesto por Van Kuppeveld y colaboradores (1992) ya que observó que trasladando su posición dos pares de bases aumentaba su sensibilidad de detección de mollicutes. Finalmente, los cebadores para amplificar la ISR se mostraron bastante sensibles, llegando a detectar hasta 151 y 210 pg/ μ l de ADN para cada especie.

Es evidente que los cebadores de Hotzel y colaboradores (2003) no detectan ninguno de los tipos de acholeplasma utilizados aquí. Al observar la cantidad de ADN disponible se aprecia que está dentro de su rango de detección, por lo que seguramente este par de cebadores no encaja en la secuencia del gen ARNr 23S de este género. En el caso de *Mesoplasma florum*, una especie que antiguamente pertenecía al género *Acholeplasma*, la explicación de no haber sido detectado debería ser por la poca cantidad de ADN de la muestra utilizada, aunque también podría ser debido a que los cebadores no fuesen compatibles con su secuencia del 23S. Al analizar estas especies se observa que la similitud entre *Acholeplasma* y *Mesoplasma florum* en la secuencia del gen ARNr 23S, en el cual están basados este par de cebadores, es de 75,1%, mientras que la similitud de ambos géneros con MMC es de aproximadamente 46,2%. Podría

inferirse, con esto que, aunque hubiera suficiente cantidad de ADN como para ser detectado, no se amplificaría ningún producto debido a la incompatibilidad de los cebadores y la secuencia del 23S de ambas especies y géneros.

II.4.4 BACTERIAS NO-MOLLICUTES

De las 21 bacterias no-mollicutes analizadas el 90,5% fue detectado por los cebadores de Spargser y colaboradores (2002) (2), mostrándose como el menos específico de todos los utilizados, mientras que el 81,2%, 76,2%, 38,1% y 4,8% con los de Hotzel y colaboradores (2003) (1), McAuliffe y colaboradores (2005) (3), Botes y colaboradores (2005) (5) y Van Kuppeveld y colaboradores (1992) (4), respectivamente. Los cebadores de Ramírez y colaboradores (2008) para la amplificación de la ISR mostraron la amplificación de uno o más productos de acuerdo a la especie de bacteria. Como se comentó anteriormente, hay bacterias que, al igual que los acholeplasmas, tienen insertado algún gen ARNt en algunas de sus copias de la ISR, lo que permite la visualización en el gel de más de un producto amplificado en la PCR. Nuestros resultados concuerdan con lo encontrado en otros estudios, quienes describen que observaron un producto amplificado al trabajar con la ISR de *Mycobacterium avium* sp., (Van der Giessen et al., 1994), *Streptococcus* sp. (Tung et al., 2007), *Lactococcus garvieae* (Blaiotta et al., 2002), *Acinetobacter baumannii* (Hernández et al., 2011) y *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Ogawa et al., 2011); y más de uno con *Bacillus cereus* (Cherif et al., 2003), *Staphylococcus aureus* (Dolzani et al., 1994), *Clostridium* spp. (Indra et al., 2010), *Fusobacterium* spp. (Conrads et al., 2002), *Aeromonas* spp. (East y Collins, 1993), *Escherichia coli* (Morgan et al., 1978), *Salmonella* enterica (Christensen et al., 2000), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Fussing et al., 1998), *Photobacterium damsela* (Osorio et al., 2005) y *Vibrio anguillarum* (Fernández y Avendaño-Herrera, 2009). La única diferencia fue la observada con la ISR de *Pseudomonas aeruginosa* que en el presente estudio mostró sólo una banda pero que en el estudio de Tyler y colaboradores (1995) mostró tres. Esto podría ser, tal vez, por alguna diferencia de la cepa utilizada o al diseño de los cebadores que solo fue capaz de unirse a un operón.

II.4.5 SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

Como se ha mencionado anteriormente, en la elección de un par de cebadores utilizados para la detección de un grupo de organismos específicos hay que considerar su sensibilidad y especificidad.

Los cebadores indicados por Hotzel y colaboradores (2003) (1) resultaron ser los menos sensibles (62,3%) con límite de detección de 15,5 ng/μl de ADN y baja especificidad (19%), no detectando ninguno de los cinco representantes del género *Acholeplasma* utilizados y detectando positivamente el ADN de 16 de las 21 bacterias utilizadas: todas las bacterias del filo *Firmicutes* y Clase *Bacilli* (géneros *Bacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*) además de otras de diversas clases y familias. Este par no nos serviría para nuestros propósitos, ya que detecta la mayoría de las bacterias acuáticas que empleamos (excepto *Vibrio anguillarum*) por lo que podría darnos resultados “falsos positivos”. Hay que añadir a esto el inconveniente que tiene el visualizar en gel la electroforesis de un amplicón tan pequeño (102-110 pb) como el amplificado en este caso, pues es necesario utilizar un gel al 3% de agarosa, el triple de un gel utilizado normalmente, para poder discriminar entre las últimas bandas de pb del marcador molecular, además de no confundir la banda del producto amplificado con la marca final del ADN cuando corre por electroforesis. Considerando el valor y gasto de agarosa, esta PCR encarecería el gasto total del análisis. Por todo lo anterior estos cebadores no serían los adecuados para nuestro estudio.

Los cebadores de Spargser y colaboradores (2002) (2) fueron los más sensibles (100%), ya que a mínimas concentraciones de ADN consiguieron amplificar productos de buena calidad. Sin embargo, su bajísima especificidad (9,5%), ya que detectó 19 de las 21 bacterias utilizadas, hacen que sea ineficaz cuando se trabaja con muestras de campo, sin filtrar o contaminadas. Ahora bien, si se tiene un cultivo puro, esta PCR es muy útil, sobre todo cuando los microorganismos crecen lentamente y se consigue extraer poco ADN de su cultivo. Aún con poco ADN genómico la secuencia del amplicón de estos cebadores serviría para ser secuenciada e identificar parcialmente una especie.

Los cebadores de McAuliffe y colaboradores (2005) (3) son sensibles (95,1%) (1,5 ng/μl de ADN), pero no amplificaron ningún producto al usar ADN de *Ureaplasma urealyticum*. Este resultado contrasta con lo publicado por McAuliffe y colaboradores (2005) donde sí son capaces de detectar miembros del género *Ureaplasma*, aunque hay que recordar que en este trabajo no se utilizó el gel con gradiente de desnaturalización ni el colorante de ADN SYBR Gold, que es mucho más sensible que el Gel Red. Considerando que se han encontrado representantes de este género en cetáceos (McLaughlin et al., 2012), pinnípedos (Volokhov et al., 2012B) y peces (Tetlock et al., 2012; Zhang y Feng (NP)) y que nuestro objetivo es trabajar con especies marinas, estos cebadores podrían ser inadecuados para este estudio. Hay que añadir, además, que, al igual que los cebadores analizados anteriormente, éstos son demasiado inespecíficos (23,8%), ya que 16 de 21 bacterias fueron detectadas, considerando las del filo *Firmicutes* y Clase *Bacilli* (géneros *Bacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*) y del Orden *Vibrionales*, familia *Vibrionaceae* (géneros *Vibrio* y *Photobacterium*) además de otros órdenes y familias. Estos resultados difieren con los presentados por los propios autores (McAuliffe et al., 2005) de este par de cebadores, quienes no observaron la amplificación de ningún producto al utilizar ADN de *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus suis* como en el presente estudio. Los autores no indican la concentración de ADN empleado en sus ensayos, tal vez emplearon cantidades por debajo del límite de detección necesario para visualizar el producto amplificado, lo que podría ser la razón de tal divergencia con nuestros resultados. En todo caso, al detectar la mayoría de las bacterias acuáticas no creemos que sean adecuados para la detección de mollicutes en muestras de campo, tal vez sí en cultivos puros, aunque en este caso es más recomendable el uso de los cebadores nombrados anteriormente en base a su mayor sensibilidad.

Los cebadores que mostraron los mejores resultados corresponden a los indicados por Van Kuppeveld y colaboradores (1992) (4) y Botes y colaboradores (2005) (5). Ambas PCR's tienen el mismo cebador *de vuelta* (*reverse*), mientras que el *de ida*

(*forward*) del segundo trabajo corresponde a una pequeña modificación del indicado por el primero, desplazando su posición en dos pb. Tal modificación tuvo el propósito de aumentar la sensibilidad de la PCR. Nuestros resultados lo confirman, pues al cambiar el cebador *forward* realmente se observa que el límite de sensibilidad aumenta, al detectar menos cantidad de concentración de ADN, con un porcentaje de sensibilidad de 98,4% considerando que reconoció todos los mollicutes utilizados excepto aquel que tenía una concentración de ADN en el límite de su detección. Sin embargo, ese cambio de posición afecta su especificidad, ya que de reconocer sólo una bacteria no-mollicutes como positiva, pasó a reconocer ocho con el *forward* modificado, por lo que, finalmente, no sería el adecuado para el presente estudio. Podemos decir que la mejor pareja de cebadores para nuestros propósitos es la de Van Kuppeveld y colaboradores (1992) ya que tiene una sensibilidad razonable (98,4%) además de ser muy específico (95,2%), por lo que podría emplearse incluso en muestras “contaminadas” sabiendo que si se amplifica algún producto hay una alta probabilidad que provenga del ADN de un mollicutes y no de otro tipo de bacteria (alto valor predictivo positivo). Nuestros resultados concuerdan con lo encontrado por esos autores.

Los cebadores de Ramírez y colaboradores (2008) amplificaron la ISR en todos los mollicutes y con una sensibilidad muy buena, por lo que podría utilizarse sin problemas en la identificación específica de nuevos mollicutes, excepto en muestras con una concentración de ADN menor a 10 ng/μl, ya que daría una cantidad de producto amplificado de poca calidad para ser secuenciado. Cuando se quiere determinar la especie de un acholeplasma, tampoco serían útiles debido a que amplifican más de un producto de la ISR lo que torna el análisis de su secuencia imposible.

II.4.6 PCR A TIEMPO REAL

Después de determinar que los cebadores descritos por Van Kuppeveld y colaboradores (1992) eran los más adecuados en sensibilidad y especificidad para nuestro estudio surgió la idea de probarlos y ver su eficacia cuando eran utilizados en una PCR a tiempo real. Con fines comparativos también realizamos esta técnica

utilizando los cebadores de Botes y colaboradores (2005). Una de las aplicaciones que tiene la técnica de PCR a tiempo real es la detección cualitativa rápida y sensible de fragmentos de ADN que puedan interesar. El ahorro de tiempo al no tener que realizar una electroforesis posterior al protocolo de PCR propiamente tal, así como la capacidad del instrumento de detectar hasta pequeñas cantidades de fluorescencia automáticamente y sin el sesgo que puede tener el “observar” a ojo las bandas, hacen que esta técnica sea útil y eficiente. Cada día es más utilizada y ya se han realizado numerosos trabajos describiendo cebadores y protocolos para la detección de agentes patógenos: bacterias, parásitos, etc. En esta línea, también se ha utilizado fragmentos de los genes ribosómicos ARNr 16S, 23S, de la ISR u otros genes para el desarrollo de protocolos “a tiempo real” para la detección de mollicutes en animales, subproductos animales, biofarmacéuticos y cultivos celulares (Baczynska et al., 2004; Rebelo et al., 2011; Becker et al., 2012; Martínez-Díaz et al., 2013). Esta técnica, incluso, ya ha sido validada oficialmente para detectar mollicutes en estos últimos (European Pharmacopoeia, 2011; Duguid, 2013). Algunas de las ventajas de la PCR a tiempo real son la cuantificación directa de los amplificados y riesgo mínimo de contaminación de los productos de PCR, al evitar la manipulación post-PCR.

En nuestro estudio se observó que todas las muestras, incluidos los controles negativos, presentaron un resultado positivo en lo que se refiere a la producción de fluorescencia. En la PCR a tiempo real el proceso de PCR se monitoriza mediante la cuantificación de la fluorescencia de los fluoróforos o sondas marcadas que se unen al DNA para detección general de DNA de doble cadena, para monitorizar la cantidad de una secuencia "blanco" específica. El SYBR Green es un fluoróforo que se intercala de forma inespecífica con el surco menor de la doble cadena de ADN, pero no al ADN de cadena sencilla. La ventaja de emplear SYBR Green es que se puede incluir junto a los demás reactivos de la reacción de PCR y detectar cualquier producto amplificado, independientemente de su secuencia. Los inconvenientes son que tanto los productos específicos como los no específicos generan señal y que no es posible detectar simultáneamente varias reacciones de amplificación distintas en el mismo tubo. Para

evitarlo, el diseño de los cebadores debe ser cuidadoso y evitar la formación de dímeros entre ellos o uniones inespecíficas al ADN (*mispriming*). Sin embargo una forma de verificar si son verdaderos o falsos positivos es analizando la curva de desnaturalización. Si un producto presenta un perfil de desnaturalización diferente (valores de T_m diferentes), significa que es otro producto (no específico) de amplificación (Löffert, 2013; TIB Molbiol, disponible en: <http://www.tib-molbiol.es/es/lightcycler/principle/realtime.html>).

Por lo que la idea fue simplificar su análisis, de manera a tener resultados rápidos y fáciles de ser interpretados, que en nuestro caso fue el observar únicamente el pico de la temperatura de fusión de la muestra para saber si había ADN de mollicutes o no. Esta temperatura de fusión ($^{\circ}\text{C}$) es la temperatura a la cual el ADN se convierte en ADN de una sola cadena (simple) y depende de su secuencia de bases, por ejemplo, los fragmentos de ADN de doble cadena que tienen más Citosinas y Guaninas requieren más calor para romper los tres puentes de hidrógeno (H^+) ellas, en cambio, necesita menos calor (energía) para la separación de los dos puentes de H^+ de la Timidina y Adenina. Su definición formal es “temperatura a la cual el 50% del ADN es de cadena simple” (Forbes et al., 2009).

Para verificar si estos cebadores serían útiles para nuestro objetivo fue necesario observar cómo se visualizaban los resultados en el gráfico obtenido por PCR a tiempo real, así como determinar su sensibilidad, para lo cual fueron utilizados todos los mollicutes, bacterias no-mollicutes y diluciones de *M. mycoide* sp. *capri* y *Acholeplasma* utilizados anteriormente.

Nos dimos cuenta que todos los mollicutes (no importando su género) mostraban un pico de su temperatura de fusión en el rango de 84,5 a 87 $^{\circ}\text{C}$, mientras que el control negativo y las bacterias diferentes a mollicutes lo presentaban siempre por bajo de 84,5 $^{\circ}\text{C}$ y cercano a 82 $^{\circ}\text{C}$, siendo muy fácil reconocer e interpretar los resultados. Esto sucedió con ambos pares de cebadores empleados.

Las ventajas que observamos al comparar la PCR convencional y a tiempo real utilizando los mismos cebadores fue el aumento de sensibilidad que experimentan: de detectar la dilución 10^{-2} a 10^{-4} al usar los cebadores indicados por Van Kuppeveld y colaboradores (1992); y de 10^{-3} a 10^{-5} , con los de Botes y colaboradores (2005).

Pudimos, además, comprobar que con la PCR a tiempo real también se aumenta la especificidad de los cebadores. Un ejemplo es lo observado con el ADN de *Fusobacterium* spp. En todas las PCR's convencionales utilizadas esta especie amplificó productos de mismo tamaño que los mollicutes, inclusive con los cebadores de Van Kuppeveld y colaboradores (1992) se obtuvo copias de un amplicón como si fuera realmente de la Clase *Mollicutes*, algo que ya había sido observado anteriormente en un estudio realizado por Jensen y colaboradores (1999). Lo curioso es que al usar la PCR a tiempo real con estos últimos cebadores, la temperatura de fusión fue de 82 °C, mostrando indudablemente que correspondía a ADN proveniente de una bacteria no-mollicute. Es decir, empleando los mismos cebadores en la PCR convencional se reconocía como un mollicutes, mientras que la PCR a tiempo real, como una bacteria diferente. En este caso, si utilizamos la PCR convencional tendríamos un falso positivo con el ADN de *Fusobacterium* spp., sin embargo, la PCR a tiempo real, conseguiría discriminar esta especie y dar un resultado correcto. Algo similar ocurrió con los cebadores de Botes y colaboradores (2005); el ADN de las bacterias *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Photobacterium damsela* (3 cepas), *Streptococcus suis* y *Vibrio anguillarum* con el que en la PCR convencional se amplificaban productos semejantes a mollicutes; presentaron en la PCR a tiempo real valores próximos a 82 °C, mostrando que eran realmente diferentes de mollicutes. Sin embargo, *Streptococcus agalactiae* fue detectado como positivo en ambas PCR's.

CAPÍTULO III: Microorganismos de la Clase *Mollicutes* en organismos marinos

III.1 ANTECEDENTES

El presente capítulo da cuenta del trabajo de identificación de mollicutes en cetáceos varados en las Islas Canarias entre los años 2010 y 2013; de pinnípedos muestreados en la Isla Decepción (Shetland del Sur, Antártica) entre los años 2010-2011; así como de invertebrados marinos muestreados en las costas canarias y peces provenientes de cultivos marinos experimentales o del ambiente natural. A continuación se presenta la metodología, resultados y discusión del trabajo llevado a cabo con las muestras.

III.1.1 MAMÍFEROS MARINOS

III.1.1.1 Importancia y situación del estudio de mamíferos marinos.

El grupo de mamíferos marinos comprende aproximadamente 120 especies que se han adaptado a la vida acuática en el mar o dependen directamente de él para su alimentación. Taxonómicamente es muy diverso, incluyendo dos órdenes exclusivamente acuáticos **CETÁCEA** (ballenas, delfines, marsopas, etc.) y **SIRENIA** (dugongo y manatíes), así como a tres superfamilias del orden **CARNIVORA**: **PINNIPEDIA** (focas, otáridos y morsas), **MUSTELIDAE** (nutrias) y **URSIDAE** (oso polar), que considera especies adaptadas a la alimentación en el medio acuático. Estos mamíferos pueden ser encontrados en todos los océanos, desde las aguas de los polos hasta las del Ecuador y son parte esencial de la biodiversidad del ecosistema marino. A pesar de que el número de estas especies es menor en comparación con las terrestres, su biomasa total es grande y nada despreciable, siendo componentes integrales y esenciales dentro de su ecosistema y jugando un papel muy importante al regular las poblaciones de sus presas. Además, son considerados excelentes bioindicadores de los cambios ambientales a medio y largo plazo debido a la longevidad de algunas especies y su posición en la cima de la cadena trófica (Rengifo-Herrera, 2013). A pesar de su importancia ecológica, muchas de estas especies se consideran en riesgo o bajo amenaza de extinción debido, entre otros factores, a su caza indiscriminada y a la

contaminación y ocupación antropogénica de sus hábitats. Con el objetivo de minimizar estos impactos negativos y proteger las especies más amenazadas se han llevado a cabo muchos planes de protección a nivel mundial, considerando el estudio de su ecología y biología con el propósito de diseñar protocolos y estrategias de manejo de protección, así como para la determinación de áreas de preservación natural (International Fund for Animal Welfare, www.ifaw.org; International Union for Conservation of Nature, www.iucn.org; Oceana www.oceana.org; Whale and Dolphin Conservation, uk.whales.org; entre otras organizaciones).

El Archipiélago Canario es una excelente fuente de material de estudio de mamíferos marinos, principalmente de cetáceos ya que es el hábitat permanente o de pasaje de casi 30 especies de estos mamíferos. Entre los factores que hacen de este archipiélago un lugar ideal para los cetáceos están: su posición geográfica estratégica, entre aguas tropicales y frías, justo en la ruta migratoria de varias especies; sus particularidades oceanográficas (temperaturas, grandes profundidades cerca de la costa al carecer de plataforma continental por ser de origen volcánico y la existencia de zonas de calmas en el sur-sureste insular, entre otras), o bien por la abundancia de presas en sus aguas (Carrillo et al., 2006; Arbelo-Hernández, 2007; Ortega-Martín et al., 2009). Existen también registros del siglo pasado de colonias de foca monje (*Monachus monachus*) en las islas más orientales aunque actualmente sólo han sido observados algunos ejemplares de forma esporádica y no hay una población fija residente (Espino et al., 2006).

Otro ecosistema que también posee grandes poblaciones de mamíferos marinos corresponde al territorio Antártico. Este ecosistema ha sido durante mucho tiempo uno de los menos afectados por la influencia antropogénica, sin embargo, en los últimos años la presencia humana ha ido en aumento. Algunas de las consecuencias de tal incremento están relacionadas con aspectos sanitarios, como la aparición o reaparición de enfermedades virales, bacterianas, fúngicas o parasitarias entre la fauna nativa (Rengifo-Herrera, 2013), así como la bioacumulación de contaminantes químicos en los

tejidos de los organismos y una mayor susceptibilidad a enfermedades infecciosas (Rengifo-Herrera, 2013). Los pinnípedos antárticos constituyen uno de los grupos más representativos en el ecosistema antártico y se ha comprobado que constituyen excelentes especies centinelas para estudiar tales impactos; por lo que se han realizado diversos estudios para conocer el estado sanitario de las poblaciones naturales y sus cambios en el tiempo; de esta manera, se ha estudiado la presencia y frecuencia de agentes parasitarios e infecciosos relevantes en ellas (García-Peña et al., 2010; Pedraza-Díaz et al., 2011; Tryland et al., 2012). Hasta ahora no se ha realizado ningún estudio de identificación de mollicutes en estas especies antárticas por lo que hacerlo representa un gran aporte a la generación de conocimiento acerca de ellas, considerando sobretodo que estas bacterias podrían estar relacionadas con enfermedades.

III.1.1.2 Origen de las muestras de mamíferos marinos utilizadas

III.1.1.2.1 Cetáceos

Las muestras de **CETÁCEOS** provinieron de los muestreos realizados por la **División de Histología y Patología Animal** del **IUSA** (Instituto de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria, Universidad de las Palmas de Gran Canaria - **ULPGC**), quienes entre sus líneas de investigación cuentan con la de “Patología de los Cetáceos”, uno de cuyos objetivos es el estudio de los cetáceos presentes en el archipiélago canario. Para tal propósito son monitorizados todos los ejemplares que varan en las islas. Un equipo del grupo de investigación se desplaza al lugar del varamiento o traslada el ejemplar a las instalaciones de la Facultad de Veterinaria de la ULPGC y recoge muestras para diferentes análisis que puedan determinar la condición fisiológica y nutricional del ejemplar, así como su causa de muerte y posibles patologías. Su protocolo de trabajo incluye, por lo tanto, el registro de sus medidas morfométricas, la evaluación de su condición fisiológica basada en clasificaciones específicas para cetáceos, además de la toma de muestras de sus órganos para posteriores análisis histopatológicos. La

oportunidad de trabajar con esta División fue posible gracias a su director, Dr. Antonio Jesús Fernández Rodríguez quien, junto a su equipo de trabajo, se mostró dispuesto a colaborar con nuestros objetivos mediante la toma de muestras para la identificación de mollicutes en los cetáceos trabajados. Para este propósito, fue adicionado a su protocolo usual de muestreo un “*Protocolo para la toma de muestras en cetáceos para la identificación de mollicutes*” (**Anexo V.2.1**), que fue llevado a cabo cada vez que se analizó un cetáceo varado. Una vez que las muestras llegaban al IUSA eran recogidas por el doctorando y continuado el proceso de cultivo microbiológico e identificación específica.

Hay que recalcar la buena disposición de este equipo de trabajo y su cooperación en todo momento, siguiendo rigurosamente el protocolo de toma de muestras, así como en posteriores análisis y datos solicitados para completar la información de los ejemplares procesados.

III.1.1.2.2 Pinnípedos de la Isla Decepción (Antártica)

El trabajo con muestras de **PINNÍPEDOS**, por otra parte, se pudo realizar gracias a un convenio de trabajo realizado con el **Laboratorio Central de Veterinaria de Algete** (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Algete-Madrid). A través del Jefe de su Departamento de Bacteriología General, Dr. Francisco Javier García Peña, fue posible acceder a muestras microbiológicas tomadas en pinnípedos en la Isla Decepción (latitud 62° 58'S; longitud 60° 40'O), en las Islas Shetland del Sur (Antártica), durante 2010. Tales muestras correspondían al proyecto “**Presencia de Agentes Infecciosos y Parasitarios en Fócidos y Otáridos**” de la Universidad Complutense de Madrid y llevado a cabo dentro de la Campaña Antártica del Ejército de Tierra 2010-2011. Se colectaron muestras para su análisis microbiológico. Se determinó la presencia de varias especies bacterianas, incluyendo a microorganismos de la clase *Mollicutes*. En el laboratorio de Algete se aislaron unos 70 mollicutes, que fueron enviados a nuestro laboratorio donde fueron procesados, cultivándolos e identificándolos posteriormente

mediante los protocolos de cultivo y técnicas de genética molecular utilizadas usualmente en nuestro grupo.

III.1.2 INVERTEBRADOS Y PECES MARINOS

III.1.2.1 Importancia y situación del estudio de invertebrados y peces marinos.

Como se dijo anteriormente, debido a su posición geográfica y riqueza de nutrientes que posee en sus aguas, entre otros factores, las islas Canarias poseen un rico y valioso ecosistema marino. Debido a las consecuencias negativas que muchas veces puede tener la acción entrópica sobre los ecosistemas, en general es necesario preservarlos a través de medidas que consideren muchos aspectos. Una de las formas de hacer esto es generar conocimiento científico de él, estudiando por ejemplo: dinámicas poblacionales, composición específica, estado sanitario, etc. Uno de los aspectos que es interesante estudiar tiene relación con las poblaciones microbiológicas (bacterias y virus) que se encuentran en el ecosistema. Se sabe que algunas especies bacterianas pueden ser simbiotes o beneficiosas para el hospedador, mientras que otras, muy por el contrario, pueden ser patógenas. Las nuevas técnicas de análisis molecular ayudan bastante en este tipo de estudio, permitiendo detectar y describir de forma relativamente fácil las poblaciones bacterianas presentes en la muestra de un cierto hábitat u organismo. Como se demostró en la revisión bibliográfica, existe interés en conocer qué tipos de mollicutes pueden estar asociados a los organismos acuáticos y qué papel cumplen dentro de su ecosistema, por lo que cada vez que es posible acceder a muestras de organismos acuáticos es deseable muestrearlo y analizarlo desde este punto de vista.

Por otra parte, y también ligado a la riqueza del ecosistema marino de Canarias ha surgido en los últimos años la idea de diversificar la economía de las islas a través del aprovechamiento de sus recursos naturales. Una forma de llevar esto a cabo es la implantación de centros de cultivos de acuicultura, que puedan cultivar especies locales, abriendo así un nuevo tipo de actividad profesional unido a la disminución de la

explotación de las poblaciones silvestres de tales especies. El Gobierno de Canarias viene invirtiendo en esta área a través de algunas líneas de investigación del **Instituto Canario de Ciencias Marinas – ICCM** y del **Instituto Tecnológico de Canarias (ITC)**. *Está claro que invertir en el conocimiento biológico de las especies empleadas en acuicultura es extremadamente importante, útil y necesario, para el desarrollo de estrategias de cultivo y producción eficientes.* Debido a que actualmente las reservas naturales de peces están siendo excesivamente explotadas, la acuicultura se presenta como una buena opción en la producción de recursos pesqueros, con fines económicos o inclusive para repoblación. Uno de los problemas con que se enfrenta el cultivo de especies acuáticas corresponde a la falta de conocimiento biológico de ellas, aspecto fundamental a la hora de establecer protocolos de cultivo eficientes. Uno de estos aspectos está relacionado directamente con las enfermedades y patógenos asociados a las especies en cultivo, especialmente en cultivos comerciales intensivos en los que se emplean altas densidades, provocando estrés y la subsecuente inmunodepresión en los peces cultivados. Los mollicutes son bacterias que han sido estudiadas e indicadas como causantes o asociadas a enfermedades en especies ganaderas. En peces se han encontrado algunas especies de mollicutes pero los estudios de su identificación en peces son escasos y su papel en el desarrollo de enfermedades en peces todavía no está claro, identificándose hasta ahora una única especie, *M. mobile*, asociada directamente con la producción de enfermedades de peces de agua dulce.

III.1.2.2 Origen de las muestras de invertebrados y peces marinos utilizadas.

III.1.2.2.1 Invertebrados marinos

Se tomaron muestras de medusa luminiscente, *Pelagia nocticula*, y de carabela portuguesa, *Physalia physalis*, aprovechando los varamientos masivos que se produjeron entre 2011 y 2013 en la playa Las Canteras (Latitud: 28° 8' 25" N - Longitud: 15° 26' 9" O) en la isla de Gran Canaria (España).

Las muestras de pota (*Todarodes sagittatus*), así como algunas de peces, fueron tomadas gentilmente por las Dras. María José Caballero y Mónica Betancor, ambas pertenecientes al **Grupo de Investigación en Acuicultura (GIA)** de la ULPGC, quienes se trasladaron a la isla canaria de “El Hierro”, con el objetivo de tomar muestras para sus propias investigaciones histopatológicas de las especies que estaban muriendo por causa de una erupción volcánica submarina en sus proximidades.

Las muestras de pulpo (*Octopus vulgaris*) provinieron de ejemplares mantenidos en cultivos experimentales por el GIA. El encargado de esa especie, Dr. Juan Estefanell, y su director, Dr. Juan Socorro, cedieron gentilmente todos los individuos que tenían disponibles para la toma de muestra para la presente tesis.

III.1.2.2.2 **Peces**

La mayoría de las muestras de peces utilizadas provinieron de los cultivos experimentales llevados a cabo por el GIA. Gracias a las gestiones realizadas por uno de los encargados del GIA, Dr. Daniel Montero, fue posible acceder a los ejemplares una vez que las experiencias terminaran. Hay que destacar la ayuda de las integrantes del **Grupo de Enfermedades Infecciosas e Ictiopatología** del IUSA, que prestaron toda su cooperación cuando fue necesario.

El resto de los peces provinieron de cuatro muestreos realizados en la proximidades de la erupción volcánica submarina cerca de la isla “El Hierro”.

III.2 METODOLOGÍA

El tratamiento de las muestras de cetáceos, pinnípedos, peces e invertebrados marinos (dos especies de medusa y dos de cefalópodos) utilizadas en el presente estudio fue muy similar. Una vez que las muestras fueron tomadas, procesadas y puestas en el medio general para bacterias o uno para el cultivo de mollicutes (hisopos estériles o líquido) se mantenían en incubación a 37 °C (mamíferos marinos) ó 25 °C (peces e invertebrados marinos) al menos 24 h, después de lo cual fueron filtradas al medio para mollicutes y puestas a incubar con las mismas condiciones anteriores donde eran mantenidas hasta que se observase un cambio de turbidez o color, como señal de crecimiento bacteriano. Si las muestras no cambiaban en turbidez ni color por lo menos durante un mes, se les extraía ADN y se le sometía a una PCR a tiempo real para detectar la presencia de mollicutes. Todos los pasos restantes relacionados con el cultivo microbiológico (crecimiento en placa, mantenimiento del cultivo, etc.) e identificación y caracterización de mollicutes fueron muy similares para todos explicándose en detalle aquellos aspectos particulares a cada grupo o especie trabajada.

III.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO.

III.2.1.1 Cetáceos

Las muestras fueron tomadas de cetáceos varados: 72 ejemplares de 15 especies diferentes en las Islas Canarias y Almería (cinco ejemplares) entre los años 2010-2013 (**Tabla III-2**). Los muestreos fueron realizados en terreno o durante la necropsia de ejemplares varados frescos y de algunos que llevaban de 1 a 3 meses congelados a -20 °C en la Facultad de Veterinaria de la ULPGC. La recogida de muestras de boca, conjuntiva, espiráculo, pulmones, hígado, riñón, genitales (testículos u ovarios y útero), orificio urogenital; así como en cualquier zona que presentase algún tipo de infección conspicua (mamitis, artritis, etc.) fue realizada por arrastre utilizando hisopos estériles. Una vez tomadas las muestras los hisopos eran inoculados inmediatamente en tubos plásticos que contenían 2 ml del medio de cultivo general RPMI-1640

suplementado con 10% de suero equino (fuente de colesterol) e incubados a 37 °C en condiciones aeróbicas (**Figura III-1**).



Figura III-1: Toma de muestras de un delfín listado (*Stenella coeruleoalba*) en las instalaciones de la Facultad de Veterinaria de la ULPGC (**A**). Introducción de un hisopo estéril en el ano (**B**). También fueron tomadas muestras de las articulaciones que mostraban artritis (**C**). Los hisopos eran inoculados inmediatamente en tubos conteniendo 2 ml del cultivo general RPMI-1640 suplementado con 10% de suero equino (fuente de colesterol) e incubados a 37 °C en condiciones aeróbicas (**D**).

III.2.1.2 Pinnípedos de la Antártica

Las muestras se tomaron con torundas de la boca y vagina de 58 ejemplares de lobo marino antártico *Arctophoca gazella* [anteriormente *Arctocephalus gazella* (Berta y Churchill, 2012)]; 17 de focas de Weddell *Leptonychotes weddellii*; y 5 elefantes marinos *Mirounga leonina* de la Isla Decepción (Islas Shetland del Sur, Antártica) (**Figura III-2** y **Tabla III-8**). Los muestreos fueron realizados en 2010 y las torundas fueron colocadas en el medio de transporte FBP (Gorman and Adley, 2004) con un 0,5% de carbón activado y se mantuvieron a -20 °C hasta la llegada al Laboratorio Central de Veterinaria

de Algete donde se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento. El aislamiento se hizo en el medio SP4-II (Ramírez, 1999) y una vez conseguido el crecimiento, los cultivos en líquido o en bloques de agar se congelaron a -80 °C en medio FBP sin carbón activado, hasta que los cultivos fueron enviados a la Facultad de Veterinaria de la ULPGC.



Figura III-2: Ejemplares de Lobo marino antártico *Arctophoca gazella* (A), Foca de Weddell *Leptonychotes weddellii* (B) y Elefante marino *Mirounga leonina* (C). Fotos de ARKIVE (<http://www.arkive.org>).

III.2.1.3 Peces marinos

Las muestras fueron obtenidas de 112 ejemplares de 21 especies diferentes de peces entre los años 2010 y 2013. La mayoría de los ejemplares procedieron de cultivos experimentales llevados a cabo por el GIA en las instalaciones del ICCM (*Dicentrarchus labrax*, *Solea senegalensis*, *Sparus aurata*, *Thunnus thynnus*) (**Figura III-3** y **Tabla III-17**) mientras que otros cuatro grupos de peces de profundidad de diversas especies fueron tomados en las proximidades de la erupción volcánica submarina cerca del la isla canaria de “El Hierro”. Los muestreos fueron realizados diseccionando los ejemplares y arrastrando hisopos estériles en la superficie interna de la boca, en branquias e intestino.

Una vez obtenidas las muestras, los hisopos eran inoculados inmediatamente en tubos plásticos conteniendo 2 ml de SP4-II al 1,5% de cloruro de sodio e incubados a 25 °C en condiciones aeróbicas. Los sitios de muestreo fueron escogidos de acuerdo a las porciones corporales más comunes donde según la literatura habían sido detectados mollicutes en peces, mientras que la salinidad utilizada estuvo basada en los protocolos usuales de detección y cultivo de especies bacterianas marinas (Stanley y Morita, 1968; Román et al., 2012).

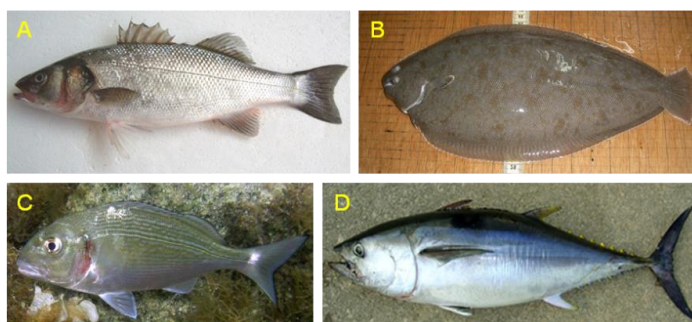


Figura III-3: Fueron obtenidas muestras de ejemplares de lubina (*Dicentrarchus labrax*) (A), lenguado (*Solea senegalensis*) (B), dorada (*Sparus aurata*) (C) y atún (*Thunnus thynnus*) (D). Fotos de FishBase (<http://www.fishbase.org>).

III.2.1.4 Invertebrados marinos

III.2.1.4.1 Medusas

Se tomaron muestras de medusa luminiscente, *Pelagia nocticula* (Figura III-4), y de carabela portuguesa, *Physalia physalis* (Figura III-5), aprovechando los varamientos masivos que se produjeron entre 2011 y 2013 en la playa Las Canteras (Latitud: 28° 8' 25"N - Longitud: 15° 26' 9"O) en la isla de Gran Canaria (España). Se recogieron medusas en tres fechas diferentes. Los ejemplares, que se encontraban vivos y varados en la playa, fueron puestos en agua de mar y transportados directamente al laboratorio de Epidemiología y Medicina Preventiva del IUSA para su procesamiento. Fueron triturados en grupos de 20 ó 40 individuos de acuerdo a su tamaño y diluidas con agua

de mar. El número de agrupaciones analizadas en total fueron nueve. Cada muestra fue filtrada por papel filtro normal de laboratorio. Doscientos mililitros del filtrado fueron inoculados en 2 ml de SP4-II al 1,5 % de cloruro sódico y de ese cultivo se realizaron dos diluciones seriadas a la menos 10, a 10^{-1} y 10^{-2} . Todos los cultivos fueron incubados a 18 °C en condiciones aeróbicas en una estufa refrigerada.

III.2.1.4.2 Cefalópodos

Por otra parte, se tomaron muestras de branquias e intestino de dos ejemplares de pota (*Todarodes sagittatus*) encontrados muertos en las proximidades de la erupción volcánica submarina cerca del la isla canaria de “El Hierro” en 2011 y congelados a -20 °C hasta su procesamiento (**Figura III-6**). Adicionalmente, también se obtuvo muestras de cuatro ejemplares frescos y tres congelados de pulpo (*Octopus vulgaris*) procedentes de cultivos experimentales por el GIA en las instalaciones del ICCM. Por cada individuo se tomó una muestra de las branquias, esófago y glándula digestiva. En los ejemplares frescos se tomaron además muestras de estómago, intestino, gónada, sifón y ojos (**Figura III-7** y **Tabla III-20**). Para ambas especies las muestras fueron recogidas empleando hisopos “por arrastre” sobre el órgano objetivo durante su disección, el que inmediatamente fue inoculado en 2 ml de SP4-II al 1,5 % de cloruro sódico e incubados a 18 °C en condiciones anaeróbicas (300 µl de parafina líquida en la superficie del cultivo).

III.2.2 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

III.2.2.1 *Filtración y verificación del crecimiento bacteriano*

Pasadas al menos 24 h de incubación y constatándose un cambio de color del medio que señalase crecimiento bacteriano, el cultivo fue filtrado en forma estéril (*Acrodisc® Syringe Filters* (Pall) con abertura de poro de 0,45 µm) e inoculado a 2 ml de medio usado para el cultivo de mollicutes SP4-II (Ramírez et al., 1997). Las condiciones de incubación fueron las mismas utilizadas previamente, para las muestras obtenidas de mamíferos la temperatura de incubación fue de 37 °C. En el caso de

trabajar con invertebrados marinos se utilizó inicialmente el medio SP4-II con un 1,5% de cloruro de sodio y una temperatura de incubación de 18 °C en una estufa refrigerada, pero tras obtener los primeros aislamientos y analizar su crecimiento a diferentes temperaturas y porcentajes de cloruro de sodio se reformuló el medio al 3% de cloruro de sodio y la temperatura de incubación a 25 °C. Una vez que fue observado un cambio del color del medio, se sembraban placas de cultivo (del mismo medio) y se mantenían en incubación hasta observar la formación de colonias. Paralelamente, era tomado 1 ml de la muestra para la extracción de ADN y posterior aplicación de técnicas de genética molecular. También fue tomado 1 ml de medio de aquellas muestras que no presentaron ningún cambio de color al menos por dos semanas (muestras de mamíferos marinos) o un mes (muestras de peces e invertebrados marinos) después de filtradas con el propósito de verificar la presencia de ADN de mollicutes.

III.2.2.2 Clonación

Una vez que fue observado el crecimiento de colonias típicas de mollicutes (forma de huevo frito), las muestras fueron clonadas, tomando una colonia individual y llevándola a 2 ml de SP4-II con o sin cloruro de sodio. Una vez que el cultivo estaba crecido se sembraba una placa y se repetía el proceso. Para garantizar la pureza del cultivo cada aislamiento fue clonado al menos tres veces (Tully y Whitcomb, 1995).

III.2.2.3 Mantención y almacenamiento de los cultivos

Con el fin de mantener los cultivos vivos, semanalmente fueron subcultivados, inoculando 200 µl de cultivo original a 2 ml de medio fresco.

Adicionalmente, y siguiendo las indicaciones de Leach (1983), fueron congeladas alícuotas de 2 ml de cultivo añadiendo 2 ml de solución de inositol con suero equino como protector criogénico. Pasadas 24 h a -80 °C las muestras fueron liofilizadas en un liofilizador Telstar.

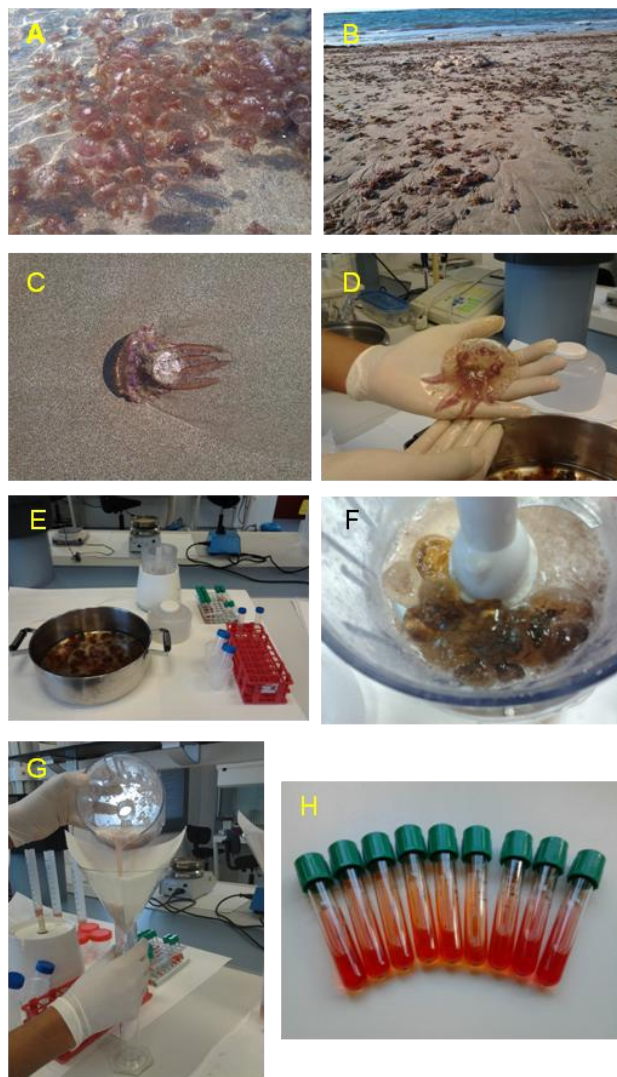


Figura III-4: Toma de muestras de ejemplares de medusa luminiscente, *Pelagia nocticula*, durante varamientos naturales en la playa “Las Canteras” (Gran Canaria, España) (A, B y C). Su procesamiento consistió en agrupar individuos (D y E), tritularlos (F) y filtrarlos (G) para su posterior inoculación en tubos con el medio SP4-II al 1,5% de cloruro sódico (H).



Figura III-5: Toma de muestras de ejemplares de carabela portuguesa, *Physalia physalis*, durante varamientos naturales en la playa “Las Canteras” (Gran Canaria, España) (A y B). Su procesamiento consistió en agrupar individuos (C), triturarlos (D) y filtrarlos (E) para su posterior inoculación en tubos con el medio SP4-II al 1,5% de cloruro sódico.



Figura III-6: Ejemplar de pota (*Todarodes sagittatus*). Foto de A.M. Arias (<http://www.ictioform.es/>)

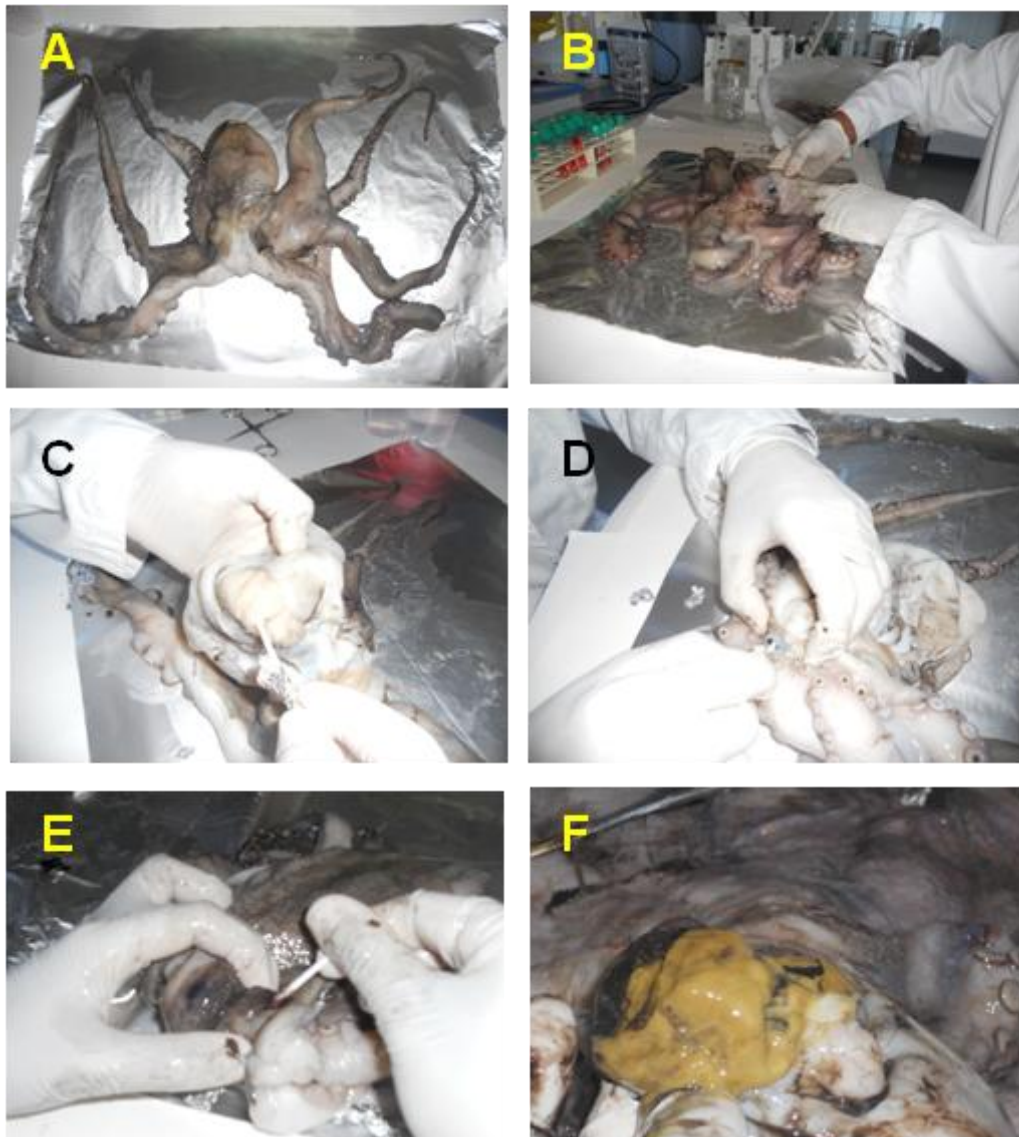


Figura III-7: Toma de muestras de un ejemplar de pulpo (*Octopus vulgaris*) (A): Disección (B) y el muestreo por arrastre usando un hisopo estéril en las branquias (C), esófago (D), ojos (E) y glándula digestiva (F).

III.2.3 TÉCNICAS DE GENÉTICA MOLECULAR

III.2.3.1 Extracción de ADN

El ADN fue extraído utilizando el kit comercial *Realpure Genomic* (Real) y su concentración fue cuantificada en un espectrofotómetro *NanoDrop 1000* (Thermo Fisher Scientific).

III.2.3.2 PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a tiempo real

Para confirmar la presencia de ADN de alguna especie de la clase *Mollicutes* fue realizada una PCR a tiempo real utilizando cebadores para amplificar un fragmento del gen ARNr 16S que resultó ser específico para mollicutes (ver Capítulo II) (Van Kuppeveld et al., 1992) (**Figura III-8**). Los cebadores utilizados fueron GPO-3 (5'-GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATA CCC T-3') (*forward*) y MGSO (5'-TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC-3') (*reverse*), y el protocolo consideraba un ciclo de desnaturalización de 94 °C por 5 min; 40 ciclos de 94 °C por 30 s, 60 °C por 30 s y 72 °C por 30 s y un ciclo final de 72 °C por 30 s. Dicho protocolo fue llevado a cabo en un *MyiQi Cycler Detection System* (Bio-Rad) empleando un sistema de incubación de 25 µl, conteniendo 12,5 µl de *iQ SYBR Green Supermix* (Bio-Rad), 1 µl (20 µM) de cada cebador, 5 µl de muestra, y agua *PCR-grade* (Sigma). Como control positivo fue utilizado ADN de *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (Y-GOAT) y como negativo, agua. Los resultados fueron analizados empleando el programa *MyiQ system 1.0.410*. También fue analizada la curva de disociación resultante, considerando una muestra como positiva cuando su temperatura de fusión estuvo entre 85 y 87 °C.

III.2.3.3 PCR para secuenciación

Todas las muestras que fueron positivas por PCR a tiempo real a la presencia de mollicutes fueron sometidas a PCR's convencionales, amplificando el gen ARNr 16S entero (Yavari, 2010) y la región intergénica entre los genes ARNr 16S y 23S (ISR) (Ramírez et al., 2008A) (**Figura III-9**). Cuando el producto amplificado de ISR obtenido

era muy poco debido a poca cantidad de ADN disponible se utilizó una PCR más sensible fragmento del gen ARNr 16S de 580 pb para su identificación específica, por medio de una PCR muy sensible (Spergser et al., 2002) (**Figura III-8**). Adicionalmente, y para la descripción de nuevas especies encontradas fue secuenciado el gen ARNr 23S (Poveda et al., 2012) (**Figura III-10**) y la región entre los genes ARNr 23S y 5S (ISR2) (Ramírez et al., 2010) (**Figura III-11**). Para obtener la secuencia entera del gen ARNr 16S fue necesario dividirla en tres fragmentos que fueron amplificados mediante PCR's separadas. Para el fragmento A fueron utilizados los cebadores 16S-Start pos (5'-GAG AGT TTG ATC CTG CGT CAG G-3') y 16S-550 neg (5'-CCC AAT AAA TCC GGA TAA CGC TTG C-3'); para el B, 16S-510 pos (5'-CTG ACG CGT AAC TAT GTC CCA GCA G-3') y 16S-1050 neg (5'-GCT GAC GAC AAC CAT GCA GC-3'); y para el C, 16S-980 pos (5'-CGA AGA ACC TTA CCC ACT CTT GAC ATC-3') y 16S-end neg (5'-GGT AAT CCA TCC CCA CGT TCT CG-3'). Para la ISR se utilizaron los cebadores 16S+C (5'-CGT TCT CGG GTC TTG TAC AC-3') y 23S-B (5'-CGC AGG TTT GCA CGT CCT TCA TCG-3'). El protocolo de PCR fue igual para todos los fragmentos amplificados e ISR y consistió en un ciclo de desnaturalización de 94 °C por 2 min; 35 ciclos de 94 °C por 15 s, 60 °C por 30 s y 72 °C por 30 s; y un ciclo final de 72 °C por 30 s. Los cebadores para la amplificación de un fragmento del gen ARNr 16S fueron MW28 (5'-CCA GAC TCC TAC GGG AGG CA-3') y MW29 (5'-TGC GAG CAT ACT CAG GC-3'), y su protocolo de pcr consideró un ciclo de desnaturalización de 94 °C por 1 min; 35 ciclos de 94 °C por 80 s, 55 °C por 80 s y 72 °C por 2,5 min; y un ciclo final de 72 °C por 5 min. La amplificación del gen ARNr 23S fue dividida en seis fragmentos, utilizando los juego de cebadores mostrados en la **Tabla III-1**. La ISR2 fue amplificada usando los cebadores 23S+S (5'-GCT CTT AGT ACG AGA GG-3') y 5S-A (5'- GCT TAA CTT CTG TGT TCG GAA TGG G-3'). El protocolo de PCR para los fragmentos A y F, así como ISR2 consistió en un ciclo de desnaturalización de 94 °C por 2 min; 35 ciclos de 94 °C por 15 s, 45 °C por 30 s y 72 °C por 2 min; y un ciclo final de 72 °C por 1 min. El protocolo para los restantes fragmentos fue similar, difiriendo sólo en la temperatura de alineamiento que en vez de ser de 45 °C fue de 55 °C. Todos estos protocolos fueron ejecutados en un termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf) con un sistema de incubación de 25 µl utilizando

illustra™ PureTaq™ Ready-to-Go™ PCR beads (GE Healthcare), 1 µl (20 µM) de cada cebador, 3 µl de muestra, y agua *PCR-grade* (Sigma). Los controles positivo y negativo fueron los mismos que los utilizados anteriormente. Para confirmar su amplificación, a los productos de PCR se les realizó una electroforesis (100 V por 50 min) en un gel de agarosa (1% p/v en tampón TAE 1x) teñido con Gel-Red (Biotium) (0,025 µl/ml) y posteriormente visualizado en un transiluminador (Bio-Rad).

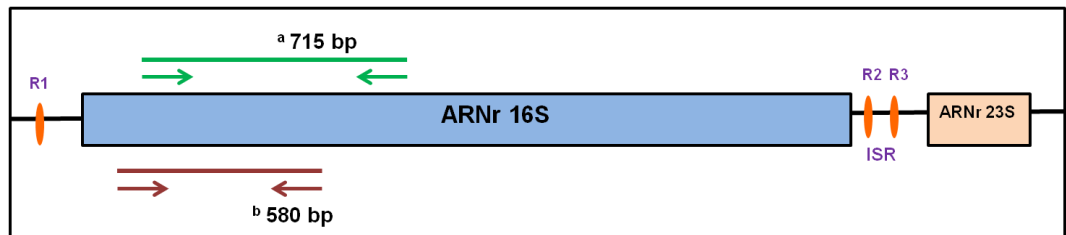


Figura III-8: Representación esquemática de los cebadores indicados por Van Kuppeveld y colaboradores (1992)^a y Spergser y colaboradores (2002)^b. R: Regiones complementarias.

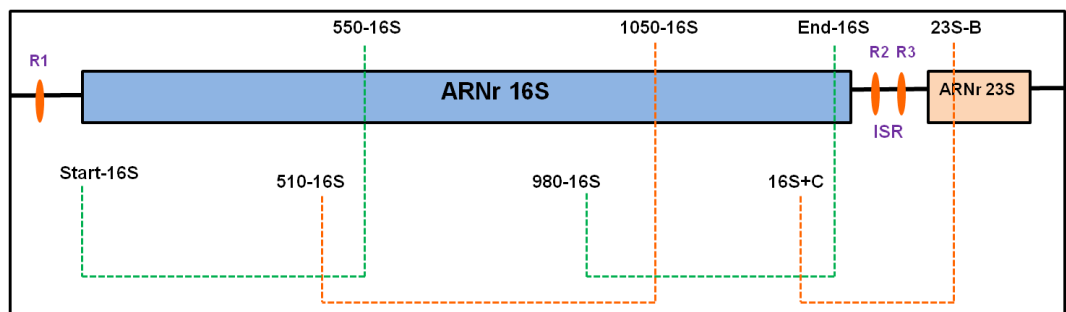


Figura III-9: Representación esquemática de los cebadores utilizados para amplificar el gen ARNr 16S (Yavari, 2010) y la región intergénica ISR (cebadores 16S+C y 23S-B) (Ramírez et al., 2008). R: Regiones complementarias.

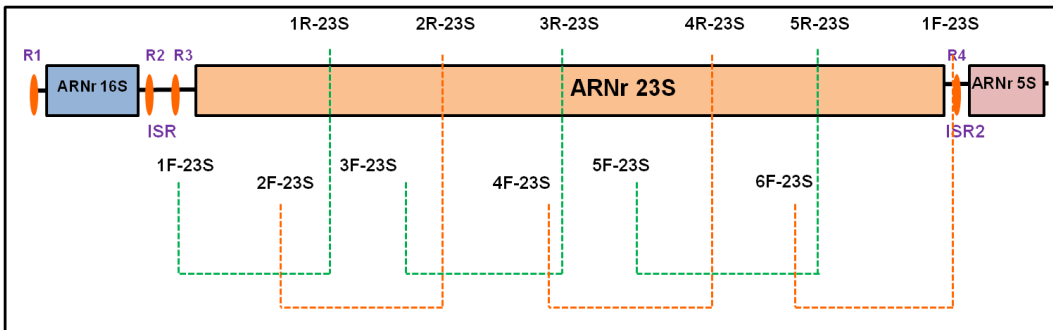


Figura III-10: Representación esquemática de los cebadores utilizados para amplificar el gen ARNr 23S (Poveda et al., 2012). R: Regiones complementarias.

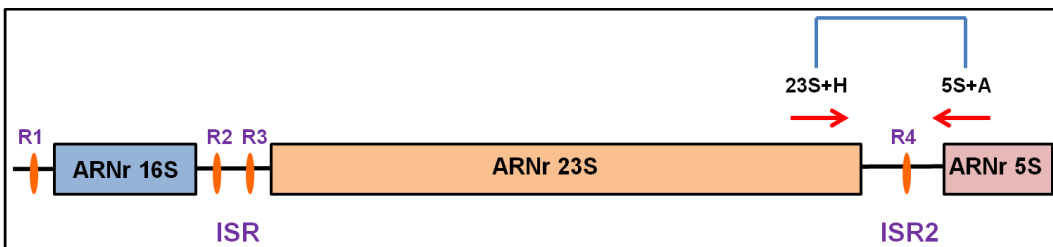


Figura III-11: Representación esquemática de los cebadores utilizados para amplificar la región intergénica ISR2 (Ramírez et al., 2010). R: Regiones complementarias.

Tabla III-1: Pares de cebadores utilizados para la amplificación del gen ARNr 23S (Poveda et al., 2012)

| Fragmento | Cebadores |
|--------------------|---|
| <i>Fragmento A</i> | 23S – 1F (5'- GTT CTT TGA AAA CTG AAT ATT A -3') 23S – 1R (5'-CTT TTC ACC TTT CCC TCA CGG TAC-3') |
| <i>Fragmento B</i> | 23S – 2F (5'-GCG AAA TCG GAA GAG GCC AAA C-3') 23S – 2R (5'-CAC CGC TAG CCA CAA GTC ATC C-3') |
| <i>Fragmento C</i> | 23S – 3F (5'-GGT GAT CTA GCC ATG AGC AG-3') 23S – 3R (5'-CCA TCG GCT ACG CTT TTC AGC C-3') |
| <i>Fragmento D</i> | 23S – 4F (5'-GTA ACG TTT CGA AGT GAG AAT C-3') 23S – 4R (5'-CCG TTA TAG TTA CGG CCG CCG TTC-3') |
| <i>Fragmento E</i> | 23S – 5F (5'-GAC ACC TGC CCA GTG CCG GAA GG-3') 23S – 5R (5'-CCG TCG ATG TGA ACT CTT GGG-3') |
| <i>Fragmento F</i> | 23S – 6F (5'-GAA AGT AGG ACT TAG TGA TCC GG-3') 23S – 1F (5'- GTT CTT TGA AAA CTG AAT ATT A-3') (<i>reverse</i>) |

III.2.3.4 Secuenciación y análisis de las secuencias

La secuenciación fue llevada a cabo por la empresa MacroGen Europe (Holanda) con un modelo de secuenciador de Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer.

Para la lectura de los cromatogramas (formato ABI) se utilizó el programa informático *FinchTV* versión 1.3.1 (Geospiza, Inc.). Programa que también se empleó para exportar las secuencias de dichos cromatogramas (formato SEQ). El programa *Gene Runner* 3.05 (Hasting Software Inc.) se utilizó para alinear las secuencias de ida y de vuelta de cada producto, así como en el caso de necesitar más de un producto para completar la secuenciación de los genes, obteniendo una secuencia consenso. Para comparar secuencias se utilizó el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Isis Pharmaceuticals, Inc.) y para calcular los porcentajes de similitudes entre ellas. Usándose también para obtener las imágenes de las comparaciones entre secuencias. La secuencia de nucleótidos obtenida, comparada con la base de datos GenBank empleando la aplicación *Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn)* (Atschul et al.,

1997). Los dendogramas se obtuvieron con la ayuda de la herramienta informática *MEGA 5.05* (Tamura et al., 2011) Este análisis también permite la construcción de árboles filogenéticos que reflejan esquemáticamente el grado de parentesco genético entre los mollicutes analizados. Para poder llevar a cabo este análisis se necesitó de la secuencia del gen ARNr 16S.

Para un análisis filogenético más completo de las secuencias del gen ARNr 16S, las secuencias de los micoplasmas de cefalópodos se añadieron a la base de datos de secuencias del gen ARNr 16S (LTP_s104, <http://www.arb-silva.de/projects/living-tree/>) que recopila todas las secuencias de las cepas tipo que presenten datos de alta calidad (Yarza et al., 2010). Las secuencias fueron alineadas usando el paquete informático ARB (Ludwig et al., 2004) (www.arb-home.de), y mejorado el alineamiento manualmente. Todas las reconstrucciones de árboles se realizaron empleando la versión 7.0 del algoritmo RAxML con el modelo GTRGAMMA (Stamatakis, 2006). En todos los casos, la reconstrucciones de los árboles se realizaron utilizando un filtro de conservación de secuencias del 40% para todas las bacterias (Yarza et al., 2010).

III.2.3.5 DGGE (*Denatured Gradient Gel Electrophoresis*)

Con el objetivo de caracterizar y comparar los mollicutes identificados en las muestras provenientes de pinnípedos se realizó la técnica de la *DGGE* con un fragmento amplificado del gen ARNr 16S (McAuliffe et al., 2005). Los cebadores utilizados en la PCR fueron GC341F (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3') y R543 (5'-ACC TAT GTA TTA CCG CG-3'), y el protocolo consideraba un ciclo de desnaturalización de 94 °C por 5 min; 29 ciclos de 95 °C por 60 s, 56 °C por 45 s y 72 °C por 60 s; un ciclo final de 72 °C por 10 min. Para confirmar su amplificación, los productos de PCR fueron corridos por electroforesis

(100 V por 50 min) en un gel de agarosa (1% p/v en tampón TAE 1x) teñido con Gel-Red (Biotium) (0,025 µl/ml).

El gel de *DGGE* fue elaborado a partir de dos soluciones de acrilamida al 60% y 30% p/v de urea (**Anexo V.2.3.2**), mezclando 20 ml de cada una con 182 µl de APS al 10% p/v (Sigma) y 9 µl de TEMED (Sigma). Los geles fueron montados en cristales previamente limpiados con etanol 70% y aclarados con agua bidestilada y colocados en el tanque de electroforesis con siete litros de tampón TAE 1x y mantenidos a 60 °C. El gel fue cargado con 10 µl de cada muestra mezclados con 10 µl de *Loading Buffer* (Bio-Rad). Finalmente, el gel fue sometido a una corriente constante de 60 V a 60 °C durante 16 h en un *DCode Universal Mutation Detection System* (Bio-Rad). Posteriormente, dicho gel fue teñido con SYBR® Gold (Invitrogen) (10 % v/v en tampón TAE 1x) dejándose en oscuridad durante 30 min para después ser visualizado en un transiluminador (Bio-Rad).

III.2.4 PRUEBAS DE CRECIMIENTO (CEFALÓPODOS)

Con el objetivo de determinar los rangos adecuados de temperatura y salinidad de los mollicutes aislados de cefalópodos en el medio de cultivo empleado, fueron realizadas pruebas de crecimiento sometiendo a subcultivos progresivos de cada muestra positiva a seis temperaturas de cultivo diferentes (4, 10, 18, 25, 30 y 37 °C) y, posteriormente, y basados en los resultados obtenidos, a una batería de trece porcentajes de salinidades (de 0 a 6% de cloruro sódico, con valores intermedios crecientes de 0,5 %) a dos temperaturas de cultivo, 18 y 25 °C.

III.2.5 PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Se procedió a la determinación del perfil bioquímico de cada mollicute identificado según lo descrito por Poveda (1998). En 2 ml de medio de glucosa, manosa, urea, arginina y trifetil-tetrazolium fueron inoculados 200 µl de cultivo fresco (**Anexo V.2.2.3**). En el caso de invertebrados marinos fueron utilizados medios con un 3% de cloruro sódico. Para garantizar un medio anaerobio fueron añadidos a cada tubo 300 µl

de parafina estéril. Para cada prueba fue considerado un tubo como control negativo que contenía el medio de prueba para bioquímica pero sin inóculo. La fermentación de la glucosa y manosa fue interpretada como positiva cuando el medio cambió de color, de rojo a amarillo. La reducción de arginina fue positiva cuando el medio pasó de rojo a color violeta, así como la hidrólisis de urea. La reducción de trifenil-tetrazolium fue positiva si se formaba un precipitado rojo en el fondo del tubo. El tiempo máximo para esperar una reacción positiva del cultivo fue de 2 semanas desde su inoculación. Paralelamente, fue realizada la prueba de producción de Películas y Cristales, sembrando una placa del medio utilizado con 200 µl de cultivo fresco. La prueba fue considerada positiva si se observaba la formación de cristales alrededor de las colonias y una película en la superficie.

III.2.6 ANÁLISIS HISTOLÓGICOS (CEFALÓPODOS)

Fueron realizados los análisis histológicos de las branquias y glándula digestiva de pota. Las muestras fueron mantenidas en formol tamponado (4%) hasta su procesamiento. Cada muestra fue deshidratada en alcohol en un procesador de tejidos (Histokinette 2000) e incluida en parafina (dispensador Jung Histoembedder, Leica) para después aplicarle un protocolo de tinción con hematoxilina-eosina. Posteriormente, se cortaron secciones de 5 µm en un micrótopo (Leica) para su observación en el microscopio (Olympus CX41) según los procedimientos descritos por Martoja y colaboradores (1970). Las fotografías fueron realizadas con una cámara Olympus XC30 (Olympus). Las imágenes obtenidas fueron procesadas con el programa de edición de fotografías CellB (Olympus).

III.3 RESULTADOS

La **Figura III-12** muestra una curva de disociación obtenida por la PCR a tiempo real empleando cebadores específicos para la detección de mollicutes basados en un fragmento del gen ARNr 16S (Van Kuppeveld et al., 1992).

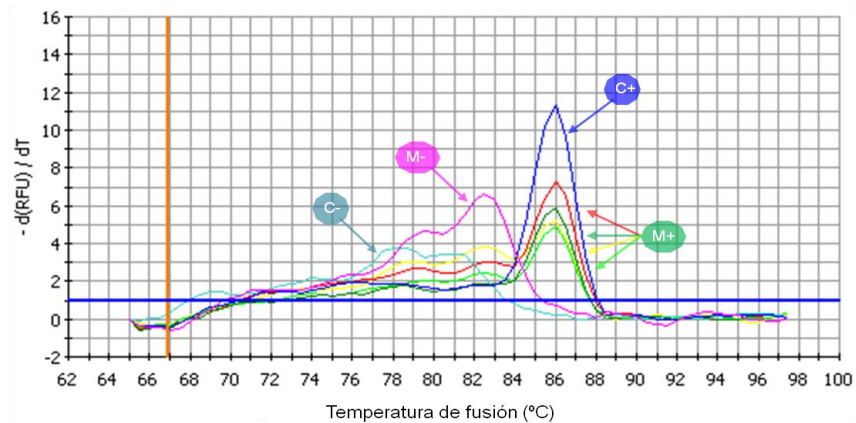


Figura III-12: Curva de disociación obtenida por PCR a tiempo real usando cebadores específicos para la detección de mollicutes basados en un fragmento del gen ARNr 16S (Van Kuppeveld et al., 1992). Las flechas indican las curvas de su mismo color, siendo: **C+**: control positivo (*M. mycoides* subsp. *capri* (Y-GOAT)); **C-**: control negativo (agua); **M+**: muestras positivas; **M-**: muestra negativa.

III.3.1 MAMÍFEROS MARINOS

III.3.1.1 Cetáceos

La **Tabla III-2** muestra los aislamientos de mollicutes identificados en los cetáceos varados en las Islas Canarias y cinco de Almería entre los años 2010-2013. La identificación de las especies de mollicutes fue realizada sin inconvenientes utilizando la secuencia de la ISR o del gen ARNr 16S. Muchas muestras que fueron positivas a la presencia de mollicutes por PCR no pudieron ser secuenciadas debido a la poca

cantidad del ADN disponible, siendo imposible obtener productos de PCR adecuados para ello. De 72 individuos analizados, se detectaron mollicutes en 22 de ellos. De estos 22 animales positivos, sólo en cinco de las muestras se disponía de suficiente cantidad de ADN para poder llevar a cabo su identificación. De las especies de mollicutes detectadas, un acholeplasma aislado de ojo y pulmón del zifio de True *Mesoplodon mirus* (Tabla III-3, Figura III-13) pudo ser cultivado y secuenciado y por lo tanto conocida la secuencia completa del gen ARNr 16S. El producto de la ISR dio dos bandas, por lo que no se pudo mandar a secuenciar. El análisis con el programa *BLASTn* dio como resultado que el microorganismo más cercano, con un 93% de similitud según el gen ARNr 16S, era *Acholeplasma axanthum* (AJ311394) (93% - gen ARNr 16S) (Figura III-14 y III-15).

En la Figura III-13 se puede observar colonias (a 40 aumentos) de *Acholeplasma* spp. provenientes del pulmón de un zifio de True, *Mesoplodon mirus*. En la Figura III-14 se muestra los productos de PCR de los tres fragmentos (A, B y C) del gen ARNr 16S.

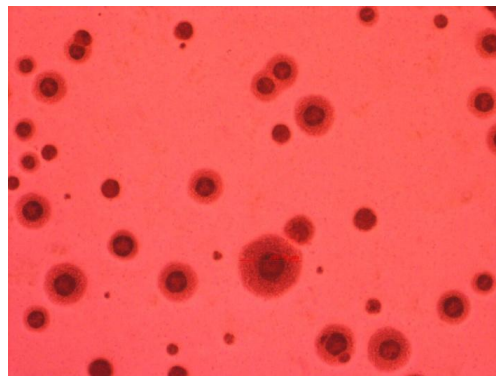


Figura III-13: Colonias del aislamiento de *Acholeplasma axanthum* AJ311394 (93% - gen ARNr 16S) con proveniente del pulmón de un zifio de True, *Mesoplodon mirus*. (40X).

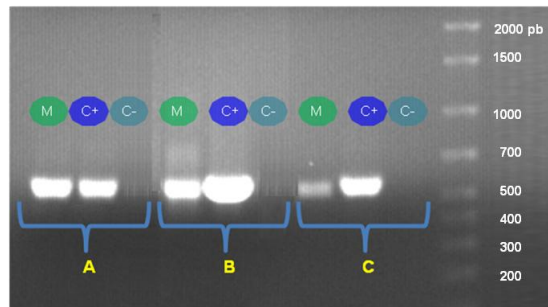


Figura III-14: Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos de PCR de los tres fragmentos del gen ARNr 16S entero (Yavari, 2010) de una muestra de cetáceos varados en las Islas Canarias entre los años 2010-2013. **C+**: control positivo (*M. mycoides* subsp. *capri* (Y-GOAT)); **C-**: control negativo (agua); **A**: fragmento A (desde el inicio del gen hasta 580 pb); **B**: fragmento B (510 hasta 1050 pb); **C**: fragmento C (980 pb hasta el final del gen).

Un mismo micoplasma fue detectado en dos ejemplares de delfín listado, *Stenella coeruleoalba* (en mama y vulva en uno y en oído, ojo, pulmón, abertura genital y articulación artrítica, en el otro), y su porcentaje de similitud con la especie más cercana en base a la secuencia de la ISR fue de 97% con el *Mycoplasma* sp. Phocoena C-264-GEN (Tabla III-4). En la Figura III-16 Se puede observar la comparación de las secuencias de la ISR de los aislamientos de mama y vulva del primer animal y de vulva del segundo. Todos los aislamientos dieron el mismo tamaño de producto de PCR de la ISR. La similitud del gen ARNr 16S de dos de los aislamientos dio como resultado un 99% con la misma cepa de *Mycoplasma* sp. Phocoena de antes (Tabla III-5, Figura III-17).

Capítulo III: Microorganismos de la Clase *Mollicutes* en organismos marinos

Tabla III-2: Cetáceos varados en las Islas Canarias o Almería entre los años 2010-2013 utilizados en el estudio de identificación de mollicutes. Número total de ejemplares y de muestras positivas a la presencia de mollicutes, especies identificadas y porción corporal donde fueron detectadas.

| Especies | Nº de ejemplares | | Mollicutes identificados ^b | Porción corporal |
|-----------------------------------|------------------|------------------------|---|--|
| | Total | Positivos ^a | | |
| Mysticeti /Balaenopteridae | | | | |
| <i>Balaenoptera borealis</i> | 1 | 1 | ND ^c | - Boca |
| Odontoceti /Delphinidae | | | (1) <i>Mycoplasma</i> sp. CSL7529-conjuntiva (99% - gen ARNr 16S) | - Ano |
| <i>Delphinus delphis</i> | 11 | 3 | (2) ND | - Pulmón - Mama |
| <i>Globicephala macrorhynchus</i> | 6 | 2 | (2) ND | - Ano - Mama |
| <i>Globicephala melas</i> | 1 | 0 | - | - |
| <i>Grampus griséus</i> | 1 | 0 | - | - |
| <i>Lagenodelphis hosei</i> | 1 | 0 | - | - |
| <i>Stenella coeruleoalba</i> | 14 | 3 | (2) <i>Mycoplasma</i> sp. Phocoena C-264-GEN (97% -ISR) | - Mama, vulva - Oído, ojo pulmón, abertura genital articulación artrítica |
| <i>Stenella frontalis</i> | 10 | 1 | (1) ND ND | - Pleura - Ano |
| <i>Tursiops truncatus</i> | 9 | 3 | (3) ND | - Mama - Espiráculo - Pulmón, vulva, ano |
| /Kogiidae | | | (1) <i>Mycoplasma</i> sp. AB703210 (98% - gen ARNr 16S) | - Espiráculo |
| <i>Kogia breviceps</i> | 5 | 2 | (1) ND | - Ojo, espiráculo |
| <i>Kogia sima</i> | 1 | 1 | ND | - Boca |
| /Physeteridae | | | | |
| <i>Physeter macrocephalus</i> | 3 | 1 | ND | - Boca, mama |
| /Ziphiidae | | | | |
| <i>Mesoplodon europaeus</i> | 3 | 1 | ND | - Útero |
| <i>Mesoplodon mirus</i> | 1 | 1 | <i>Acholeplasma axanthum</i> AJ311394 (93% - gen ARNr 16S) | - Ojo, pulmón |
| <i>Ziphius cavirostris</i> | 5 | 3 | (3) ND | - Útero - Pulmón - Pulmón |
| Total | 72 | 22 | | |

^a La determinación de las muestras positivas fue mediante una PCR a tiempo real específica para la clase *Mollicutes* usando los cebadores indicados por Van Kuppeveld y colaboradores (1992).

^b La identificación de las especies de mollicutes fue conforme a la similitud que presentaban del gen ARNr 16S y/o la región entre los genes ARNr 16S y 23S (ISR). Las secuencias fueron comparadas con especies conocidas empleando la aplicación BLASTn.

^c ND: No determinada debido a la poca cantidad de ADN disponible.

Capítulo III: Microorganismos de la Clase *Mollicutes* en organismos marinos

Entre las otras especies de mollicutes que pudieron ser caracterizadas pero no cultivadas están *Mycoplasma* sp. CSL7529-conjuntiva (99% - gen ARNr 16S) encontrado en el ano de un ejemplar de delfín común, *Delphinus delphis* (Tabla III-6) y *Mycoplasma* sp. AB703210 (98% - gen ARNr 16S) encontrado en el espiráculo de un cachalote pigmeo, *Kogia breviceps* (Tabla III-7).

Tabla III-3: Secuencia del gen ARNr 16S de *Acholeplasma axanthum* AJ311394 (93% - gen ARNr 16S) detectado en ojo y pulmón de un zifio de True, *Mesoplodon mirus* y su porcentaje de similitud con otras especies.

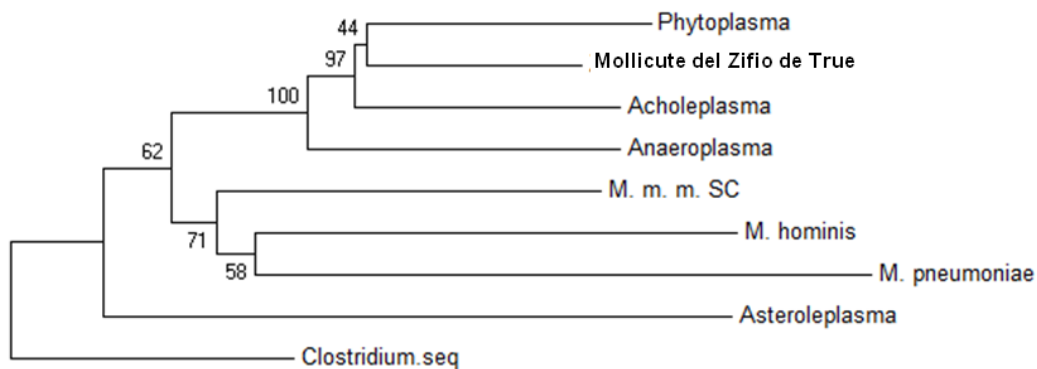
| Secuencia | Similitud ¹ |
|---|---|
| Gen ARNr 16S | |
| TGGCTCAGGATGAACGCTGGCCGCGTGCCTAATACATGCAAGTC GAACGAGAGTTTCTGTAACTCTAGTGGCGAACGGGTGAGTAAC ACGTAGGTAACTRCCCTTAAAGCAGAAATAACAGTTGGAAACGA TTGCTAATACTCGATAAGTAAACGGAAGGCATCTTCTGTATTAA AGATCCGTATGGATTACTTAAGGAGGGCCCTGCGTCGCATTAGCT ADTTGGTGRGDTAACGGCTCACCAAGGCGATGATGCGTAGCCGG ACTSAGAGTGTGAACGGCCACTGGGACTSAGACACGCCCGG ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGG AACTCTGACCAGGCAACCCGCGTGAATGAGAAGYACCTAGGT GCGTAAAATCTTTTATTAGGGAAGAATGACTGTAATAGGAAATGA TTACAGAGTGACGGTACCTAATGAATAAGCCCGCGCTACCTATGT GCCACGAGCCCGGTAAATACATAGGGGCAAGCGTTATCCGGAA TTATTGGCGTAAAGGGTGAAGTAGGCGGATGTGAAGTCTTTGGT GTAAGTGCAGTGGCTTAAACCGCTGTATGCTAAAGAACTCATGTCT AGAATCAGATAGAGGCAAGTGAATCCATGTGTAGCGTAAAT GCGTAAATATATGGAGAACACCCAGTGGCGAAGCGCGCTTCTGT GGTGTGATTAACCGTGGAGCAGCAAGCGTGGGAGCAACAG GATTAGATACCCTGGTGTCCACGCCGTAACGATGAGTACTAAG TGTTGGAGAAATTCAGTGTGTAGTAAACGCAATAGTACTCCGC CTGAGTATAGCTACCGAATGAAACTCGAAGCAATGACCGG ACCCCGCACAGCGTGGATCATGTTGTTAATTGAAAGATACCG GAAGAACTTACAGAGTCTGACATCCCTCGCAAGCTATAGAGA TATAGTGGAGGTATCGGGTGACAGGTGGTGCATGTTGTCTGTC AGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA ACCCTTATTGCTAGTTACCATGATTAAAGTTGGGAACTCTAGCGAGA CTGCCAGTGACAACTGGAGAAAGTGGGATGACGTCAAATCA TCATGCCCTTATGACCTGGGCTACAAAGGTGATACAAATGATGA AACAAAGGGCAGCAAGCTGTGACAGTAAAGCGAACTATAAAG CATTCTCAGTTCGGATTGAAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGCC GGATCCGTAGTAAATCCGCAATCGAAGTGTCCCGTGAATAGCTT CTCGGGTGTGTACACACCGCCGTCAAACCAGGAAAGTCAAGAA TACCAAAGCCGTTGGCTAACCGTAAAGGAGGAGCCGTTAAG GTAGGGTGTAGATTGGGGTTAAGTGGTAAAGAGTATCCCTAGC GGAACGTGGGATGGATCACTCCTTT | 93% <i>Acholeplasma axanthum</i> AJ311394.1 93% <i>Acholeplasma axanthum</i> strain Skripal 210 FJ876270.1 93% <i>Acholeplasma axanthum</i> strain S-743 NR_028829.1 |

¹La similitud fue obtenida comparando las secuencias de la base de datos GenBank usando la aplicación BLASTn

Tabla III-4: Secuencia de la ISR de *Mycoplasma* sp. Phocoena C-264-GEN (97% - ISR) detectado en dos ejemplares de delfín listado, *Stenella coeruleoalba* (en mama y vulva en uno y en oído, ojo, pulmón, abertura genital y articulación artrítica, en el otro), y su porcentaje de similitud con otras especies.

| Secuencia | Similitud ¹ |
|---|---|
| ISR | |
| TACACACGCCGTCACACATGGGAGCTGATAATGCCCGAAGC CGTTTGTAACTTCGAGACGACTGTCTAAGTAGGATGGTGA CTGGGGTGAAGTGTAAACAGTATCCCTACGAAACGTGGGA TGGATCACCTCCTTTCTACGGAGTACACATTGTTTCATTAGAACAAC ATACAAACAGAAATACAATTCAACAATAAATTCATTACAACAACGTA CAAAAAACATTAAGTTTATGGACTGCTATTTATATCCAGTTTTGA GGGTCTATCCTCAAATAGATCTTTGAAACTGAATAGAAAAGACA TTTGTAAATAAACAACAATAATTTCAAACGTTTGTCAACCTAT AGAATACATATCATCTAATTTCAATTTAAAAATAACAATTAG GACAAATAGTCACTAATTAATAAGTAAAGATTTTTGGTGGATGC CTTGGGTCTGGAAAGTCATGAA | 97% <i>Mycoplasma</i> sp. Phocoena C-264-GEN GU905021.1 85% <i>Mycoplasma</i> sp. Mirounga ES2774-NAASP4 GU905029.1 84% <i>Mycoplasma zalophi</i> strain CSL DQ530426.1 |

¹La similitud fue obtenida comparando las secuencias de la base de datos GenBank usando la aplicación BLASTn



0.02

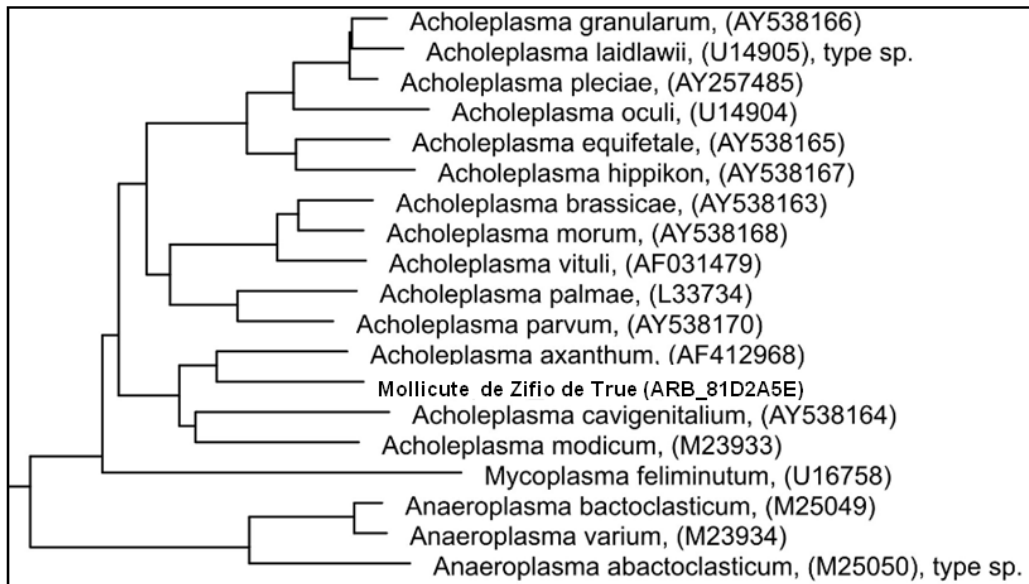


Figura III-15: Árboles filogenéticos en base a las secuencias del gen ARNr 16S y con el método de Neighbor-Joining (1000 repeticiones), donde se muestra la posición de *Acholeplasma axanthum* AJ311394 (93%- gen ARNr 16S) aislado en ojo y pulmón de un zifio de True, *Mesoplodon mirus*, con respecto de representantes de los grupos filogenéticos y en el caso del grupo *Anaeroplasma*, los representantes de sus "clusters". En el recuadro se muestra un detalle de los "clusters" más cercanos.

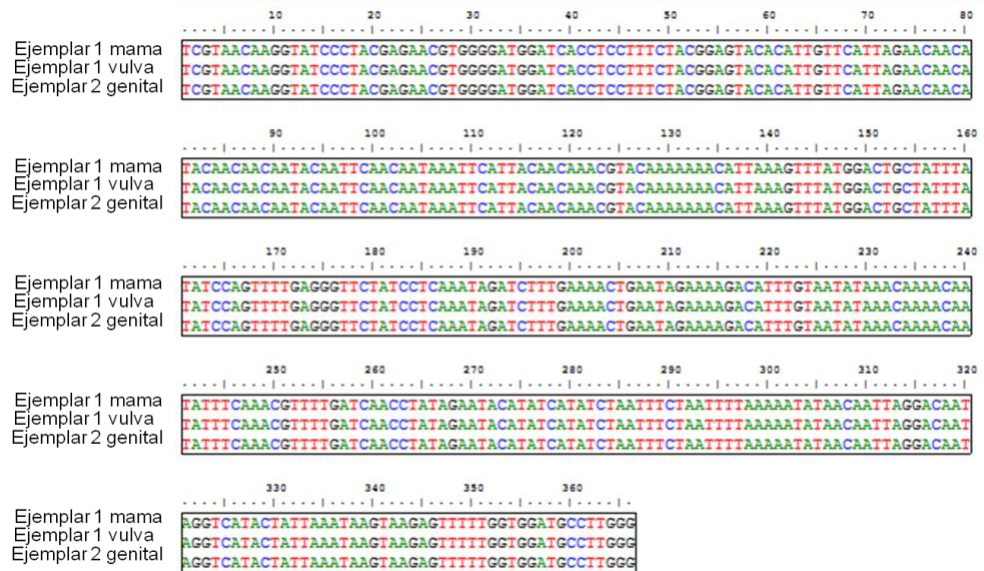


Figura III-16: Alineamiento de las secuencia de la ISR de *Mycoplasma* sp. Phocoena C-264-GEN (97% - ISR) aislado en dos ejemplares de delfín listado, *Stenella coeruleoalba*. Se comparan los dos aislamientos en la mama y vulva del primero y del genitál del segundo. Son 100% similares.

Desde la **Tabla III-5** a la **Tabla III-7** se muestra las secuencias totales o parciales del gen ARNr 16S de las cuatro muestras de cetáceos con suficiente cantidad de ADN para poder llevarlas a cabo.

Tabla III-5: Secuencia del gen ARNr 16S de *Mycoplasma* sp. Phocoena C-264-GEN (99% - gen ARNr 16S) detectado en dos ejemplares de delfín listado, *Stenella coeruleoalba* (en mama y vulva en uno y en oído, ojo, pulmón, abertura genital y articulación artrítica, en el otro), y su porcentaje de similitud con otras especies

| Secuencia | Similitud ¹ |
|--|--|
| Gen ARNr 16S | |
| CTGGCTCAGGATGAACGC TGCC TGTGTCTTAATACATGCATGTCGAACGAG TAGCTTGCTACTAGTGGCGAA TGGG TGA GTAACACGCTGCC TAACTTRCC TTTT AGATTTGGATTAACAGCGGAAACCGCTTGC TAA TACCGGA TACGCCA TAATCTC GCATGAGAA TGTG TAAAGGGGGCGCTT GCCCCACTGRAAGATGAGGGTGGC GAACATTAGTTAGTTGGTAGGGTAATGGCC TACCAAGACTA TGATGTTAGCC GGGTGAGAGAC TGAACGGCCACACTGGGAC TGAGA TACGGCCGACTCC TACGGGAGCGACGTAAGGAAAT TCCACAA TGCGGAAACCGTGA TGGAG CGACACACGCTGCACGATGAAGGCC TCGGGTCTG TAAAGTCTGTTGTTAGG GAAGAACACTTAGTGGAGGAAATGCC CACTAAGCTGACGGTACC TAACCGAA AGCGATGGCTAACTA TGTGCCAGCAGCCCGTAA TACATAGGTCGCCAGCG TTATCCGGA TAT TGGCGTAAAGCGTTCTG TAGGTGTTA TTAAG TCTGGT GTTAAGGCCGGAGCTCAACTCCGGTTTGCATCAGATAC TGTAACTGAAT GAGATAGGGTAAGCGGAA TTCCA TGTGAAGCGGTGAAATGCC TAGATAT GGAGAACACCAAAGGCGAAGCGAGCTTAC TGGGCTATA TGGACAC TGAAG GACGAAAGCGTAGGTAGCAACAGGATTA GATAGCC TCGTAGCTAGCTGT AAACGATGATCATTAGTCGGTGGAGAGTCACTGACGCGAGCTAACGCTAA TGA TCCGCTGAGTAGTATGCTCGCAAGAGTGAAACTTAAAGGAAATGACGG GGAC TCGCACAGCGGTGGAGCA TGTGGTTAA TTTGAA GATACCGGGAGAA CCTTACCGACTCTTSGACTTTC CGCAAGGATAGAGATATAGTGGAGGCTA ACGGAATGACAGATGGTGCATGGTTGCTCAGCTCGTCTGAGATGTTT GGTTAAGTCCGATAACGAGCGCAACCCCTATTTT CAGTTAA TAACAGATAGAG CTGATAACTCTGGAAACTTCCCTGGTAAACAGGAGGAGGTGGGGA TGAC GTCAATCA TGTAGTCTTACGAGTGGGGGAGACAGCTGCTAGCAATGGT GATACAAAGAGACGCAATATA GTGATAGGAGCAAACTCAA AAAATGATCT CAGTTCCGATTGAAAGTCTGCAACTCGACTTCA TGAAGTCCGAAATCGCTAGTAA TCCGASA TCA GACA TGC TGGGTGAA TACGTTCTC GAGTCTGTACACACCGC CCGTCACACCAATGGAGCTGATAAT TGGCGAAAGCGGTTGTTTAACTTGGGA GACGACTGCTTAAGTAGGATGGTGACTGGGGTGAAGTCTGTAACAAGGAT CCCTACGAGAACGTGGGATGGA TCCCTCTT | 99% <i>Mycoplasma</i> sp. Phocoena C-264-GEN GU905021.1 96% <i>Mycoplasma</i> sp. Mirounga ES2783_AG_GEN JN644768 96% <i>Mycoplasma</i> sp. Mirounga ES2714_AG_GEN JN644767 |

¹La similitud fue obtenida comparando las secuencias de la base de datos GenBank usando la aplicación BLASTn

Tabla III-6: Secuencia de un fragmento del gen ARNr 16S de *Mycoplasma* sp. CSL7529-conjunctiva (99% - gen ARNr 16S) detectado en el ano de un delfín común, *Delphinus delphis* y su porcentaje de similitud con otras especies.

| Secuencia | Similitud ¹ |
|---|---|
| Fragmento del gen ARNr 16S | |
| CCCTAGCACACGAGCCTCATCTGGACGTGATCGGGGGGGTAT CCGGAGTTATAGTCTGGTTTCAACGATCACAAGTACTCAGTT CAT TTCATGACGGGGAGGTGCGAGGCTTCTTAAACAACATACATAATG AAGCAGGTGCATTATGGTTCACTAAGTCTGATGTTACACCAAGG GAGTCTCAGCACCAGAAGAAGGAGTAACTGTACACTGGATCT TTCGGACCTGGATGTTT AAGACGGAGCTGAGATTGTAATAACA AAAAACAAGGCGTAGT CGCGGTGATCAAATAATTAACTGATAC GTGCTCACTTTCTCTCGACTCTCAGACTCCCTACGGGGAGGCGAG CAGTAGGGAATTTCCACAATGACAGAAAGTCTGATGAGCGGACA CAGGCTGCAGGAAGACGGCTTCGGGTTGTAACCTGCTGTATAA GGGAAGAAAAAGCAGTAGAGGAAATGCTATTGCCTTGACGGTACC TTGTCAGAAAGCAACGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGGGTAAT ACATAGGTTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGCGTAAAGGCTC TGTAGGTTGTGTTAAGTCTGGCGTTAAAACCTTGGGGCTCAACC CCAAATTGCGTTGGATACTGGCACGCTAGAATTGTGTAGAGGTTA GCGGAATTCCTAGTGAAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAAGA ACACCAACATGCGGAAGGCAGCTAACTGGGCACATATTGACACTG AGAGACGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCCTGGTA GTCCACGCTGTAACGATGATGATTAGCTGATAGAGAACTATCGG CCGAGCTACGCATGCC | 99% <i>Mycoplasma</i> sp. CSL7529-conjunctiva EU859984.1 99% <i>Mycoplasma</i> sp. CSL7491-lung EU859981.1 99% <i>Mycoplasma</i> sp. CSL7503-lung EU714238.1 |

¹La similitud fue obtenida comparando las secuencias de la base de datos GenBank usando la aplicación BLASTn

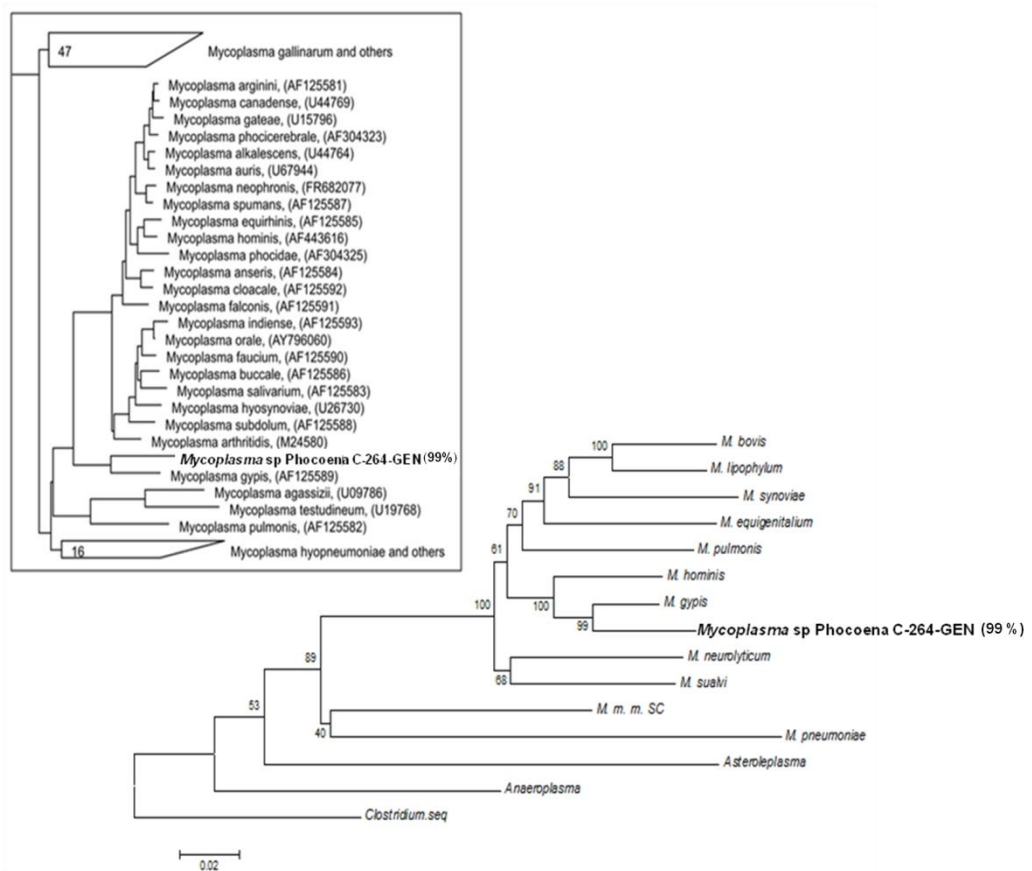


Figura III-17: Árboles filogenéticos en base a las secuencias del gen ARNr 16S y con el método de Neighbor-Joining (1000 replications), donde se muestra la posición de *Mycoplasma* sp. Phocoena C-264-GEN (99% - gen ARNr 16S) aislado en dos ejemplares de delfín listado, *Stenella coeruleoalba* (en mama y vulva en uno y en oído, ojo, pulmón, vulva y articulación artrítica, en el otro) con respecto de representantes de los grupos filogenéticos y en el caso del grupo *M. hominis*, los representantes de sus “clusters”. En el recuadro se muestra un detalle de los “clusters” más cercanos.

Tabla III-7: Secuencia de un fragmento del gen ARNr 16S de *Mycoplasma* sp. AB703210 (98% - gen ARNr 16S) detectado en el espiráculo de un cachalote pigmeo, *Kogia breviceps* y su porcentaje de similitud con otras especies.

| Secuencia | Similitud ¹ |
|---|---|
| <u>Fragmento del gen ARNr 16S</u> | |
| AAAGTTTGATGGAGCGACACAGCGTGCAGGATGAAGGTCTTCGG | 98% Uncultured Mycoplasma sp. AB703210.1 |
| ATCGTAAACTGCTGTTATAAGGGAAGAAAACTTTGTGGAGGTAAT | 97% Uncultured Mycoplasma sp AB703209.1 |
| GCCCAGAAGTACGGTACCTTATCAGAAAGCGACGGTAACTAT | 90% Uncultured bacterium clone 44F12 JF827410 |
| GTGCCAGCAGCCGCGTAAACATAGGTCGCAAGCGTTATCCGG | |
| AATTATTGGGCGTAAAGAGTTCGTAGGTGGTCTTGTCACTGAA | |
| GTTAAAGCCCGGGCTCAACCCCGGCCGCTTTGGATACTGCAA | |
| GAAGTAGATATTAGAGAGGTTAGTGGAACTCCATGTGAAGCGGTG | |
| GAATGCGTAGATATATGAAGAACACCAATGGCGAAGGCAACTAA | |
| CTGGCTAATACTGACACTGAGGAACGAAAGCGTGGTAGCAAAC | |
| AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGATCACTA | |
| GACGGTAGAAGATTTACTGTACAGCTAACGCATTAA | |

¹La similitud fue obtenida comparando las secuencias de la base de datos GenBank usando la aplicación BLASTn

III.3.1.2 Pinnípedos de la Antártica

La **Tabla III-8** muestra en forma resumida los aislamientos de mollicutes identificados en las muestras de pinnípedos muestreados de la Isla Decepción (Antártica) en 2010. Del lobo marino antártico (*Arctophoca gazella*) se obtuvieron 44 aislamientos, 36 de boca y 8 de vagina, de los 58 ejemplares muestreados. De las focas de Weddell (*Leptonychotes weddellii*) se consiguieron cultivar 10 cepas, 9 de boca y una de vagina, de los 17 ejemplares muestreados. Y de dos elefantes marinos (*Mirounga leonina*) de los cinco muestreados se aislaron dos cepas de micoplasmas, ambas de la boca. El número de especies aisladas fue de seis. Se observaron colonias típicas de micoplasmas en todas las especies (**Figura III-18**).

Tabla III-8: Distribución de las especies de mollicutes encontradas en pinnípedos provenientes de la isla Decepción (**Antártica**) según el hospedador y el origen de las muestras (**b**: boca; **v**: vagina). MZ: *Mycoplasma zalophi* (99% - ISR); MZD: *M. zalophidermidis* (99% - ISR); MC: *M. sp. CSL7529-conjunctiva* (99% - ISR); MM1: *M. sp. Mirounga ES2805-ORL* (99% - ISR); MM2: *M. sp. Mirounga ES2774-NASSP4* (91%-ISR); ML: *M. lipofasciens* ATCC 35015 (78% - ISR).

| Especies | Nº de ejemplares | | Mollicutes identificados ^b | | | | | |
|---|------------------|------------------------|---------------------------------------|-----|---------|-----|-----|----|
| | Total | Positivos ^a | MZ | MZD | MC | MM1 | MM2 | ML |
| <i>Pinnipedia / Otariidae</i> <i>Arctocephalus gazella</i> | 58 | 42 | 27b + 2v | 5v | 9b + 1v | - | - | - |
| <i>/ Phocidae</i> <i>Leptonychotes weddellii</i> | 17 | 10 | 5b | - | - | 1v | 2b | 2b |
| <i>Mirounga leonina</i> | 5 | 2 | 1b | - | - | - | - | 1b |

^a La determinación de las muestras positivas fue mediante una PCR a tiempo real específica para la clase *Mollicutes* usando los cebadores indicados por Van Kuppeveld y colaboradores (1992).

^b La identificación de las especies de mollicutes fue conforme a la similitud que presentaban de la región entre los genes ARNr 16S y 23S (ISR). Las secuencias fueron comparadas con especies conocidas empleando la aplicación BLASTn.

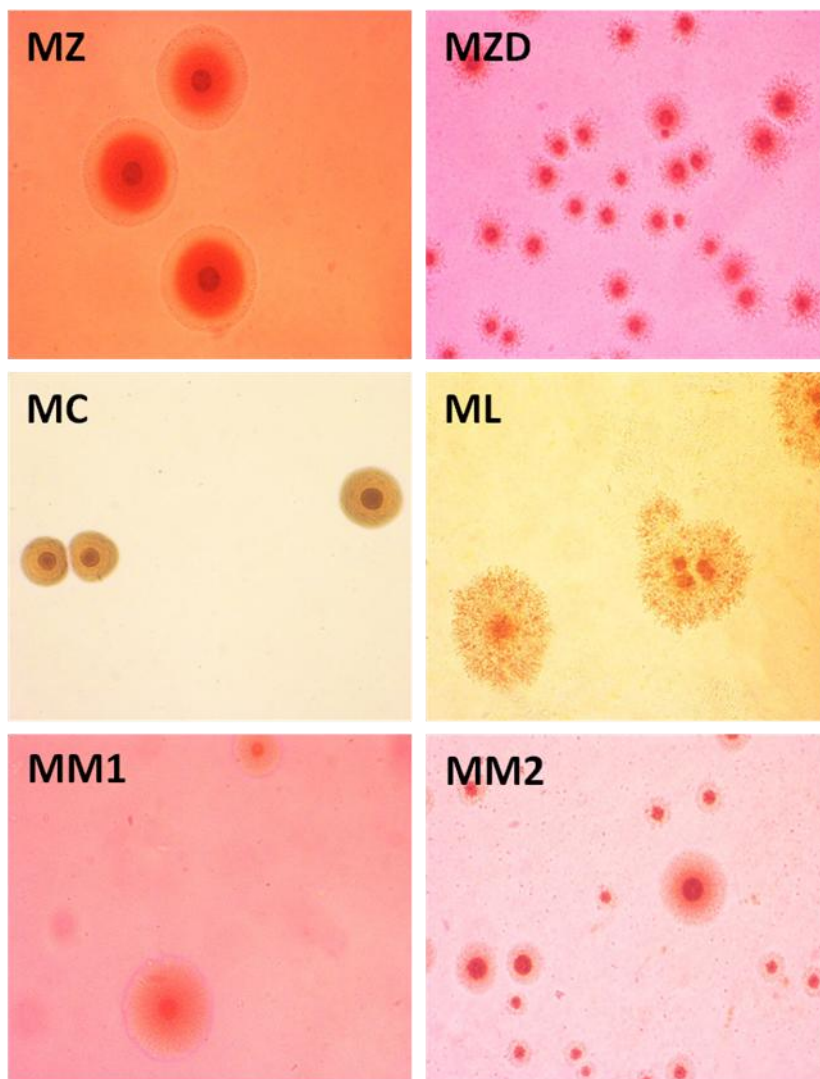


Figura III-18: Colonias de los mollicutes encontrados en pinnípedos provenientes de la isla Decepción (Antártica) **MZ:** *Mycoplasma zalophi*; **MZD:** *M. zalophidermidis*; **MC:** *M. sp.* CSL7529-conjunctiva; **MM1:** *M. sp.* Mirounga ES2805-ORL; **MM2:** *M. sp.* Mirounga ES2774-NASSP4 (91% - ISR); **ML:** *M. lipofasciens* ATCC 35015 (78% - ISR).40X.

El perfil de la ISR de las muestras provenientes de los pinnípedos de la Antártica mostró dos grupos principales de bandas: **B1** observada en las muestras conteniendo los micoplasmas MZ, MC y MM2 y con un tamaño aproximado de 300 pb; y **B2**, observada en MZD, ML y MM y con un tamaño más próximo a 400 pb (**Figura III-19**). El número de pares de bases de la ISR fue de 250 (MZ), 296 (MC), 246 (MM2), 324 (MZD), 318 (ML) y 326 (MM).

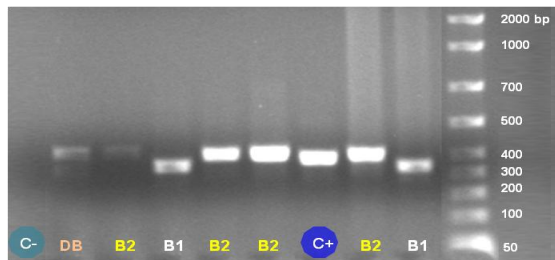


Figura III-19: Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos de PCR de la región entre los genes ARNr 16S y 23S (Ramírez et al., 2008) de muestras tomadas en pinnípedos de la isla Decepción (Antártica). **C+**: control positivo (*M. mycoides* subsp. *capri* (Y-GOAT)); **C-**: control negativo (agua); **B1**: tamaño de banda 1; **B2**: tamaño de banda 2; **DB**: doble banda; Marcador molecular y el tamaño (pares de bases) de cada banda.

El perfil de bandas de la *DGGE* de las muestras de los pinnípedos de las Antártica mostraron que tres especies de micoplasmas (MZ, MC y MM2) tienen un perfil similar y es imposible diferenciarlas visualmente (**Figura III-20**).

Las secuencias de la ISR de los seis aislamientos son mostrados en tablas: MZ (**Tabla III-9**); MZD (**Tabla III-10**); MC (**Tabla III-11**); MM1 (**Tabla III-12**); MM2 (**Tabla III-13**) y ML (**Tabla III-14**).

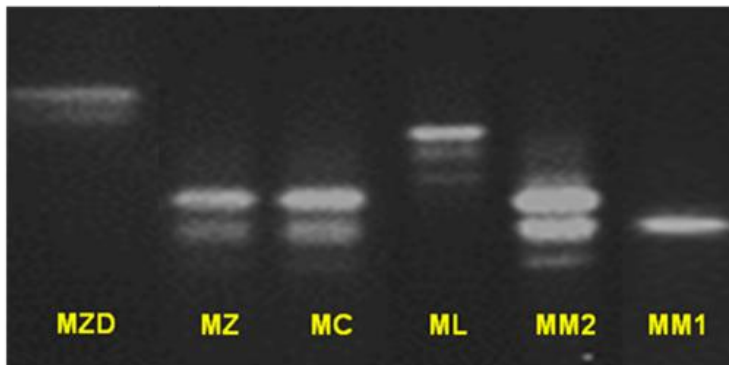


Figura III-20: Electroforesis en gel de *DGGE* de productos de una PCR específica para la clase *Mollicutes* basada en un fragmento del gen ARNr 16S (McAuliffe et al., 2005) provenientes de muestras obtenidas en pinnípedos de la isla Decepción (Antártica). **MZD:** *M. zalophidermidis*; **MZ:** *Mycoplasma zalophi*; **MC:** *M. sp.* CSL7529-conjuntiva; **ML:** *M. lipofasciens* ATCC 35015 (78%-ISR); **MM2:** *M. sp.* Mirounga ES2774-NASSP4 (91%- ISR); **MM1:** *M. sp.* Mirounga ES2805-ORL.

Tabla III-9: Secuencia de la ISR de *Mycoplasma zalophi* detectado en boca y vagina de lobo marino antártico, *Arctophoca gazella*, y en boca de foca de Weddell, *Leptonychotes weddellii*, y elefante marino, *Mirounga leonina*, de la isla Decepción (Antártica) y su porcentaje de similitud con otras especies.

| Secuencia | Similitud ¹ |
|--|---|
| ISR | |
| CTCCGGGTTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGCTGGTA ATGCCCCGAAGCCGGTTAGTTAACTTCGGAGACGACTGTCTAAGGT AGGACTGGTGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTATCCCTACGA GAACGTGGGGATGGATCACCTCCTTTCTACGGAGTACATAAGATT ATTTAAATAATAATCATATCACCATGAACTTTTAAGTTCATTTAACA GTTACAAAATCAAGATTTATGAAAATTTATATCCAGTTTTGAGAGTT CTATCTCGTATAGTTCTTTGAAAACCTGAATAGAAAAGACATTTGT AAATATTAAATTTCAAACGTTTTGATCAACCAATATAGAATACAAA ATCATATCTAATCTTAATTTAAATTAGGACAATAGGTCATACTAT TAAATAAGTAAG | 99% <i>Mycoplasma zalophi</i> strain CSL 5195 DQ840494.1 |
| | 98% <i>Mycoplasma zalophi</i> strain CSL 4296 DQ530426.1 |
| | 98% <i>Mycoplasma zalophi</i> strain CSL 4296 DQ840493.1 |

¹La similitud fue obtenida comparando las secuencias de la base de datos GenBank usando la aplicación BLASTn

Tabla III-10: Secuencia de la ISR de *Mycoplasma zalophidermidis* detectado en vagina de lobo marino antártico, *Arctophoca gazella*, de la isla Decepción (Antártica) y su porcentaje de similitud con otras especies.

| Secuencia | Similitud ¹ |
|--|---|
| ISR | |
| TTGTACACACGCCCGTCAAACCATGGGAGCTGGTAATGCCCGAA GTCGGTTTTATTAAACAACTGCCTAAGGCAGGACTGGTGACTGGGG TTAAGTCGTAACAAGGTATCCCTACGAGAACGTGGGGATGGATCA CCTCCTTTCTACGGAGTACAATGTCAAAAATACTTTTGACGAACTA ACCTTAATCAGACCTATTTACACAAACATTTTTGTCTATGGCTGTT AGGTCGCAAGCATATATCTAGTTTTGAGAGGACAATCTCTCAAAAT TGTTCTTTGAAAACCTGAATAGTAAATTTTTAAAAATTTACAACGAC ATCAAAAATATAAATTATATCAATTTGGTTAATTTGTTTTGATTGAT CGAGTAGTCATAAATATATTATGACTCATTGAAATGTCTTAAAAATAC ACATCAATAACAACAATAGGAAAATCCTAATTTAATTAATTAGGGA CATACTTTTAAATAAGTAAGAGTTT | 99% <i>Mycoplasma zalophidermidis</i> strain CSL 4779 EU714239.1 99% <i>Mycoplasma</i> sp. CSL7518-lung DQ840512.1 99% <i>Mycoplasma</i> sp. Mirounga ES2806-GEN GU905023.1 |

¹La similitud fue obtenida comparando las secuencias de la base de datos GenBank usando la aplicación BLASTn

Tabla III-11: Secuencia de la ISR de *Mycoplasma* sp. CSL7529-conjunctiva detectado en boca y vagina de lobo marino antártico, *Arctophoca gazella*, de la isla Decepción (Antártica) y su porcentaje de similitud con otras especies.

| Secuencia | Similitud ¹ |
|--|---|
| ISR | |
| CCTCCTTTCTACGGAGTACATAAGTTACAATTCATTTAGTAACAAT TACTAACCTTTAAGACCATTTTTATTTAATATTTGAGTCATGGCT TTCTTTAATGGTCAGAAAGATTTATATCTAGTTTGAGAGAAGCTT CTCTCAATTTGTTCTTTGAAAACCTGAATAGTAAAGATAAATTAAATA ACAACGACATCAATAAAAAATAATTAGTCAATTTGTTTTGTGATACC GAGTAATTTTAAATAAATAATTTATTAATAATGTCTTTGAATACATC AACAATAGGAAAATATTGAACCTTTTAAATAAGTAAGAGTGAGT | 100% <i>Mycoplasma</i> sp. CSL7529-conjunctiva EU859984.1 100% <i>Mycoplasma</i> sp. CSL7491-lung EU859981.1 97% <i>Mycoplasma</i> sp. CSL7489-oral EU859985.1 |

¹La similitud fue obtenida comparando las secuencias de la base de datos GenBank usando la aplicación BLASTn

Capítulo III: Microorganismos de la Clase *Mollicutes* en organismos marinos

Tabla III-12: Secuencia de la ISR de *Mycoplasma* sp. Mirounga ES2805-ORL detectado en vagina de foca de Weddell, *Leptonychotes weddellii*, de la isla Decepción (Antártica) y su porcentaje de similitud con otras especies.

| Secuencia | Similitud ¹ |
|---|---|
| ISR | |
| CCTCCTTCTACGGAGTACAAAGAAATATAAACACCTTGTTTATATT AACAACTTACTAGGCCTTATTTATTTTTGTGTTATGTGCTTTTTTA GGTCTAAAAAGCTTTATATCTAGTTTTGAGAGAACATTCTCTCAATT GTTCTTTGAAAACGAATAGTAAATTAAGATATTTACAACGACATC AACTAAATTAATTAATGGTTAATTTGTTTTGATTTCATCGAGTAAT CAATATTTATATAGAAATATATAAACACTATGATTCATTGAAAT GTCTTATAATACACATCAACAACATATATAAAATATAAACAATAGGAA AATACTTTAAATAAGTAAGAGTTTGTGGT | 99% Mycoplasma sp. Mirounga ES2805-ORL GU905031.1 81% <i>Mycoplasma lipofaciens</i> strain ATCC 35015 AY755604.1 81% <i>Mycoplasma lipofaciens</i> AJ780998.1 |

¹La similitud fue obtenida comparando las secuencias de la base de datos GenBank usando la aplicación BLASTn

Tabla III-13: Secuencia de la ISR de *Mycoplasma* sp. Mirounga ES2774-NASSP4 (91% - ISR) detectado en boca de foca de Weddell, *Leptonychotes weddellii*, de la isla Decepción (Antártica) y su porcentaje de similitud con otras especies.

| Secuencia | Similitud ¹ |
|---|--|
| ISR | |
| CTGGTATGCCCGAAGCCGTTTGTTAACTTCGGAGACGACTGTCT AAGGTAGGACTGGTGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTATCCCT ACGAGAACGTGGGGATGGATCACCTCCTTCTACGGAGTACAAAG ATTATTTAAATAATCATTTGATGAATGATATTTCTATGTTACA ATAAAAAGATTTAAATGTATTTATATCCAGTTTTGAGGGAATTATCT CTCTTTAGTTCTTTGAAAACGAATAGAAAAGACATTTGTAATAAA ATATTAATATTTCAAACGTTTGTATCAACCAATATAGAATACAAAAT CATATCTAATTCTAATTTAAATTAGGACAATAGGTCATACTATTA ATAAGTAAGAGTT | 91% Mycoplasma sp. Mirounga ES2774- NASSP4 GU905029.1 99% <i>Mycoplasma zalophi</i> strain CSL 4296 DQ530426.1 99% <i>Mycoplasma zalophi</i> strain CSL 4296 DQ840493.1 |

¹La similitud fue obtenida comparando las secuencias de la base de datos GenBank usando la aplicación BLASTn

Tabla III-14: Secuencia de la ISR de *Mycoplasma lipofaciens* strain ATCC 35015 (78% - ISR) detectado en boca de foca de Weddell, *Leptonychotes weddellii*, y elefante marino, *Mirounga leonina*, de la isla Decepción (Antártica) y su porcentaje de similitud con otras especies

| Secuencia | Similitud ¹ |
|--|---|
| ISR | |
| CCTCCTTTCTACGGAGTACAAAAGAACTTAATTTAATTAAGTTATTA ACCTTTTATTATCAGACCTACTTTTGGATTGTTTAGTAAAAACAAT ATTTGTTGTGTGCTTTTCTTAGGTCTAAAAAGCAATATATCTAGTT TTGAGAGGACAACTCTCAATTGTTCTTTGAAAAGTAAATAGTAAA TTACAAGATATTTACAACGACATCAAATAAATTAATAAATTAATG GTTAATTTGTTTGGATTGATCGAGTAGTCATATTAATATGATTCAT TGAAATGTCTTGGAAATACACATCAAACAACAATAGGAAAATAC TTTTAAATAAGTAAGAGTTTGTGGTGGGA | 78% <i>Mycoplasma lipofaciens</i> strain ATCC 35015 AY755604.1 78% <i>Mycoplasma lipofaciens</i> AJ780998.1 77% <i>Mycoplasma fermentans</i> CP002458.1 |

¹La similitud fue obtenida comparando las secuencias de la base de datos GenBank usando la aplicación BLASTn

En la **Tabla III-15** se muestran los porcentajes de similitud entre los seis tipos de micoplasmas aislados de mamíferos marinos de la Antártica. Los micoplasmas con el mayor porcentaje de similitud fueron MZ y MM2 (83,8%). Los alineamientos pueden verse en la **Figura III-21**.

Tabla III-15: Porcentajes de similitud entre las especies de micoplasma aisladas de muestras tomadas en pinnípedos de la isla Decepción (Antártica). **MZ:** *Mycoplasma zalophi*; **MC:** *M. sp.* CSL7529-conjunctiva; **MM2:** *M. sp.* Mirounga ES2774-NASSP4 (91% - ISR); **MZD:** *M. zalophidermidis*; **ML:** *M. lipofasciens* ATCC 35015 (78% - ISR); **MM1:** *M. sp.* Mirounga ES2805-ORL.

| SECUENCIA ISR | MZ | MC | MM2 | MZD | ML | MM1 |
|------------------|------|------|------|------|------|-----|
| MZ | ID | | | | | |
| MC | 53,8 | ID | | | | |
| MM2 | 83,8 | 55,6 | ID | | | |
| MZD | 41,1 | 51,1 | 41,3 | ID | | |
| ML | 42,9 | 57,1 | 44,4 | 68,4 | ID | |
| MM1 | 40,6 | 53,2 | 41,5 | 63,0 | 71,9 | ID |

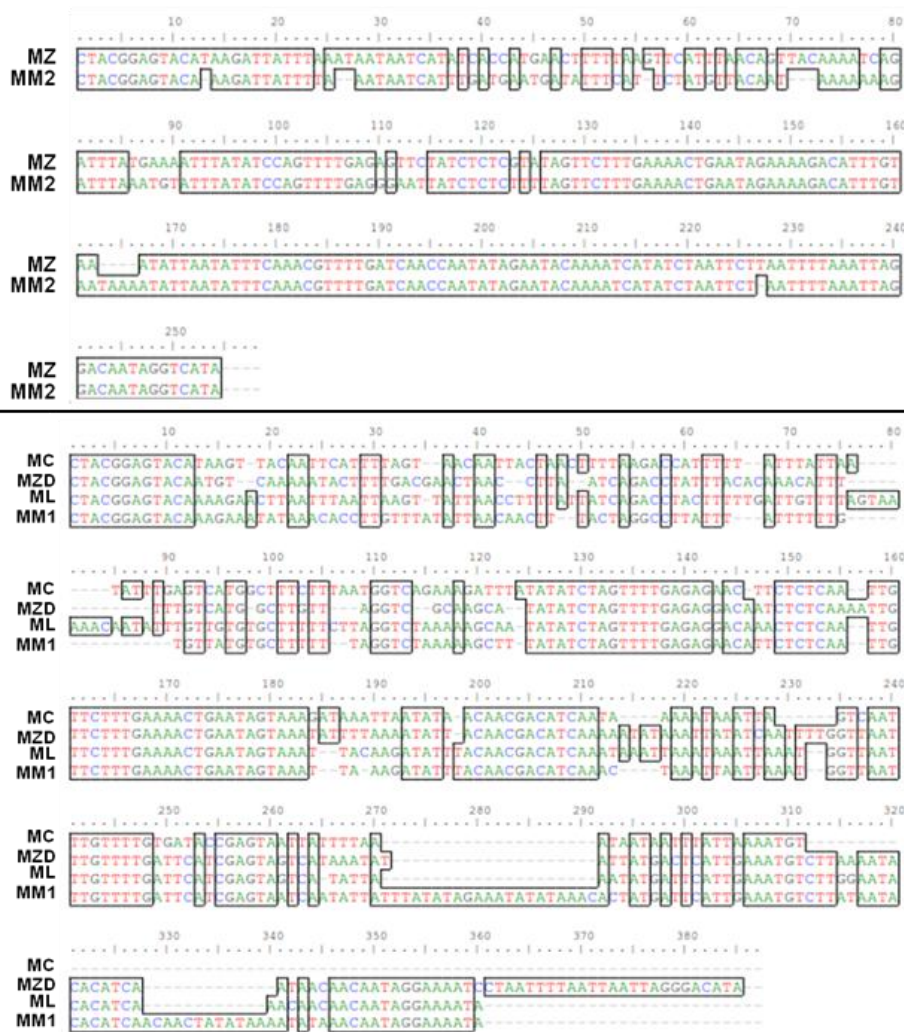


Figura III-21: Alineamientos de las secuencias de la ISR de los seis tipos de micoplasmas provenientes de muestras tomadas en pinnípedos de la isla Decepción (Antártica). **MZ:** *Mycoplasma zalophi*; **MM2:** *M. sp. Mirounga ES2774-NASSP4* (91%-ISR); **MZD:** *M. zalophidermidis*; **MC:** *M. sp. CSL7529-conjunctiva*; **ML:** *M. lipofasciens* ATCC 35015 (78% -ISR); **MM1:** *M. sp. Mirounga ES2805-ORL*.

En la **Tabla III-16** se muestra el perfil bioquímico de las especies aisladas de los mamíferos marinos de la Antártica.

Tabla III-16: Caracterización bioquímica de los micoplasmas provenientes de muestras tomadas en pinnípedos de la isla Decepción (Antártica). **MZ:** *Mycoplasma zalophi*; **MZD:** *M. zalophidermidis*; **MC:** *M. sp.* CSL7529-conjunctiva; **MM1:** *M. sp.* Mirounga ES2805-ORL; **MM2:** *M. sp.* Mirounga ES2774-NASSP4 (91% - ISR); **ML:** *M. lipofasciens* ATCC 35015 (78% - ISR). **P y C:** Películas y Cristales.

| Especies | Pruebas bioquímicas | | | | | |
|------------|---------------------|--------|----------|------|-------------|-------|
| | Glucosa | Manosa | Arginina | Urea | Tetrazolium | P y C |
| MZ | + | - | + | - | - | - |
| MZD | + | - | + | - | - | + |
| MC | + | - | + | - | - | - |
| MM1 | - | - | + | - | - | - |
| MM2 | - | - | + | - | - | - |
| ML | + | - | + | - | - | + |

III.3.2 INVERTEBRADOS Y PECES MARINOS

En la **Tabla III-17** se muestra las especies de invertebrados y peces marinos utilizados en el estudio de identificación de mollicutes. Número total de muestreos, ejemplares y de muestras positivas a la presencia de mollicutes, especies identificadas y porción corporal donde fueron detectadas.

Tabla III-17: Invertebrados y peces utilizados en el estudio de identificación de mollicutes. Número total de muestreos, ejemplares y de muestras positivas a la presencia de mollicutes, especies identificadas y porción corporal donde fueron detectadas.

| Especies | Muestreo | N° de ejemplares | | Mollicutes identificados ^b | Porción corporal |
|---|----------------|------------------|------------------------|---------------------------------------|---|
| | | Total | Positivos ^a | | |
| Cnidaria/Pelagilidae <i>Pelagia nocticula</i> | 1 ^c | 3 | 2 | <i>Spiroplasma</i> sp ^d | Individuos enteros |
| | 2 ^c | 2 | 2 | <i>Spiroplasma</i> sp ^d | Individuos enteros |
| | 3 | 4 | - | - | - |
| /Physallidae <i>Physalia physalis</i> | 1 | 3 | - | - | - |
| Mollusca/Octopodidae <i>Octopus vulgaris</i> ^e | 1 | 3 | - | - | - |
| | 2 | 1 | 1 | <i>Mycoplasma</i> sp "Myc-PULPO" | - Esófago, glándula digestiva, estómago |
| | 3 | 3 | 2 | ND ^f | - Ojo, estómago - Ojo |
| /Ommastrephidae <i>Todarodes sagittatus</i> | 1 | 2 | 2 | <i>Mycoplasma</i> sp "Myc-POTA" | - Branquias - Branquias e intestino |
| Pisces/Moronidae <i>Dicentrarchus labrax</i> | 1 | 8 | - | - | - |
| | 2 | 6 | - | - | - |
| | 3 | 5 | - | - | - |
| /Scombridae <i>Thunnus</i> sp | 1 | 6 | - | - | - |
| /Soleidae <i>Solea senegalensis</i> | 1 | 5 | - | - | - |
| /Sparidae <i>Sparus aurata</i> | 1 | 8 | - | - | - |
| | 2 | 4 | - | - | - |
| | 3 | 7 | - | - | - |
| | 4 | 7 | 2 | ND | - Branquias - Intestino |
| | 5 | 13 | - | - | - |
| Peces de fondo ^g | 1 | 17 | - | - | - |
| | 2 | 20 | - | - | - |
| | 3 | 4 | - | - | - |
| | 4 | 2 | - | - | - |

^a La determinación de las muestras positivas fue mediante una PCR a tiempo real específica para la Clase *Mollicutes* usando los cebadores indicados por Van Kuppeveld y colaboradores (1992).

^b La identificación de las especies de mollicutes fue conforme a la similitud que presentaban del gen ARNr 16S y/o la región entre los genes ARNr 16S y 23S (ISR). Las secuencias fueron comparadas con especies conocidas empleando la aplicación BLASTn.

^c En estos muestreos fueron hechos "pool" de 20 ó 40 individuos por muestra, utilizando ejemplares enteros.

^d La determinación de la especie fue conforme la similitud que presentaba según un fragmento del gen ARNr 16S, utilizando los cebadores indicados por Spergser y colaboradores (2002).

^e El primer muestreo fue realizado con ejemplares congelados (más de un mes a -20 °C); mientras que el segundo y tercero, utilizando ejemplares frescos que fueron sacrificados en ese momento.

^f ND: No determinada debido a la poca cantidad de ADN disponible.

^g Diferentes especies de peces de fondo colectadas muertas después de la erupción de un volcán submarino cercano a la isla canaria de "El Hierro".

III.3.2.1 Peces marinos

Se detectaron mollicutes con la PCR a tiempo real en dos muestras provenientes de dos doradas (*Sparus aurata*) de los 112 peces muestreados y de un total de 334 muestras. Los positivos provenían en uno de los peces de la muestra de branquias y en el otro, de intestino (Tabla III-18, Figura III-22). Fue imposible obtener un crecimiento puro en medio de cultivo líquido o en placa de alguno de ellos, debido a que las muestras estaban contaminadas con una especie sin identificar de *Vibrio* sp.

Tabla III-18: Detalle del origen, estado de desarrollo, especies y número total y de muestras positivas de los peces empleados en el presente estudio.

| Origen | Estado de desarrollo | Especies | Nº de ejemplares | | Nº de aislamientos |
|------------------------------------|----------------------|-----------------------------|------------------|------------------------|--------------------|
| | | | Total | Positivos ^a | |
| Acuicultura (GIA, Gran Canaria) | Juvenil | <i>Dicentrarchus labrax</i> | 19 | 0 | 0 |
| | | <i>Thunnus thynnus</i> | 6 | 0 | 0 |
| | | <i>Solea senegalensis</i> | 5 | 0 | 0 |
| | | <i>Sparus aurata</i> | 39 | 2 | 0 |
| Isla "El Hierro" | Juveniles y adultos | Peces de fondo ^d | 43 | 0 | 0 |
| Total | | | 112 | 2 | 0 |

Capítulo III: Microorganismos de la Clase *Mollicutes* en organismos marinos

^a La determinación de las muestras positivas fue mediante una PCR a tiempo real específica para la clase *Mollicutes* usando los cebadores indicados por Van Kuppeveld y colaboradores (1992).

^b Los ejemplares provinieron de cultivos experimentales del Grupo de Investigación en Acuicultura –GIA del IUSA.

^c Diferentes especies de peces colectadas muertas después de la erupción volcánica submarina en las cercanías de la isla canaria de "El Hierro".

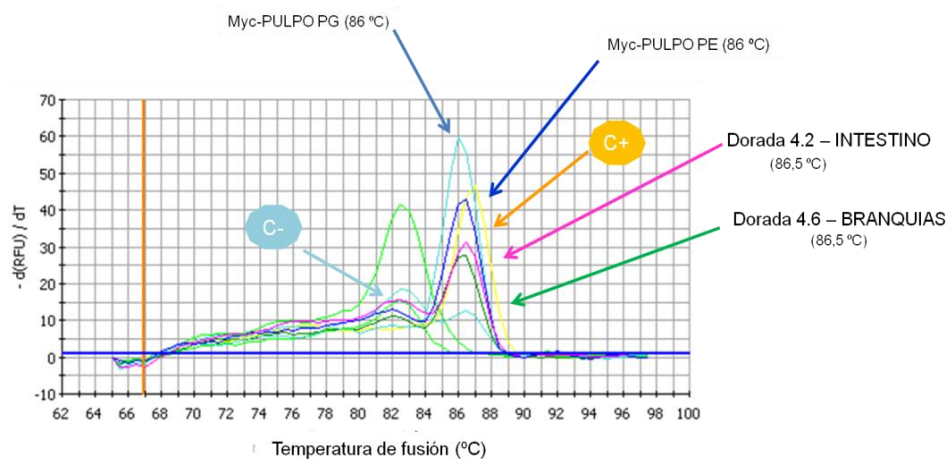


Figura III-22: Curva de disociación obtenida por PCR a tiempo real usando cebadores específicos para la detección de mollicutes basados en un fragmento del gen ARNr 16S (Van Kuppeveld et al., 1992). Las flechas indican las curvas de su mismo color correspondientes a las muestras positivas a la presencia de micoplasmas: Myc-PULPO (PG y PE) y las muestras de intestino y branquias de dos ejemplares de dorada (*Sparus aurata*) y sus respectivas temperaturas de fusión (°C). **C+**: control positivo (*M. mycoides* subsp. *capri* (Y-GOAT)) y **C-**: control negativo (agua).

III.3.2.2 Invertebrados marinos

A través de la PCR a tiempo real fueron detectadas muestras positivas a la presencia de mollicutes en cultivos provenientes de *P. noctiluca*, pulpo y pota. Los cultivos habían sido mantenidos un mes a 18 °C, en sistema de cultivo anaeróbico (excepto las provenientes de *P. noctiluca*) y sin ningún tipo de manipulación.

III.3.2.2.1 Medusas

En *P. noctiluca*, cuatro de un total de cinco muestras provenientes de dos muestreos diferentes fueron positivas a la PCR a tiempo real, verificándose a través de la secuencia de un fragmento del gen ARNr 16S (Spergser et al., 2002) que todas ellas tenían un 99% de similitud con *Spiroplasma* sp. En la **Tabla III-19** se detalla la secuencia parcial del gen ARNr 16S de la muestra Med2-4. El porcentaje de similitud de la secuencia parcial del gen ARNr 16S entre los cuatro aislamientos fue del 100%. En la **Figura III-23** se observa la comparación de dicha secuencia de dos de las muestras provenientes de los dos primeros muestreos (Med2-4 y Med5A). El tercer muestreo, que incluía a 4 muestras, resultó negativo.

El crecimiento del *Spiroplasma* sp. en medio de cultivo líquido fue verificado a través del aumento de turbidez y su cambio de color, que pasó de rojo a naranja rojizo aunque muy sutilmente, siendo difícil de ser apreciado. Para verificar que su crecimiento se mantenía en medio líquido se realizaron PCR's a tiempo real a los subsecuentes subcultivos. A pesar de crecer en medio líquido y mantenerse en el tiempo, *Spiroplasma* sp. no creció en medio sólido, por lo que no se pudieron visualizar colonias.

Debido a la poca cantidad del ADN extraído de *Spiroplasma* sp. no fue posible determinar su perfil de *DGGE* ni determinar la secuencia del gen ARNr 16S completo, ni *ISR*, así como tampoco fue posible caracterizarlo bioquímicamente debido a presentar

un crecimiento lento y a que no era claro el cambio de color de los medios bioquímicos utilizados.

De las 15 carabelas portuguesas (*Physalia physalis*) divididas y analizadas en tres grupos, ninguna dio un resultado positivo a la PCR a tiempo real ni al crecimiento.

Tabla III-19: Secuencia de un fragmento del gen ARNr 16S de *Spiroplasma* sp. detectado en ejemplares de medusa, *Pelagia noctiluca*, y su porcentaje de similitud con otras especies

| Secuencia | Similitud ¹ |
|--|--|
| Fragmento del gen ARNr 16S | |
| TGATGGAGCAATGCCGCGTGAAGACGGTCTTCGGATTGTAA AGGTCTGTTGAAGGGAAGAATAGTAAGTATAGGAAATGATACTTA TTTGACGGTACCTTACCAGAAAGCCACGGCTAACTATGTGCCAGC AGCCGCGGTAATACATAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGG GCGTAAAGCGTGCGCAGACGGTTTAAACAAGTTTGGGGTCAAATCC TGGAGCTCAACTCCAGTTGCGCTTGAAAAGTGTAAAGCTAGAGTG TAGGAGAGGTCGATGGAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG ATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGTCGACTGCCCTAT CACTGACGTTTAGGCACGAAAGCGTAGGGAGCAAATAGGATTAGA TACCCTAGTAGTCTACGCCGTAACCGATGAGTACTAAGTGTCCGA CTAAGTTCGGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGTACTCCGCCTGAGT | 99% <i>Spiroplasma</i> sp. MUF0901 HM598634.1 99% <i>Spiroplasma melliferum</i> clone 16 KF706372.1 99% <i>Spiroplasma</i> sp. MF0903 HM037702.1 |

¹La similitud fue obtenida comparando las secuencias de la base de datos GenBank usando la aplicación BLASTn

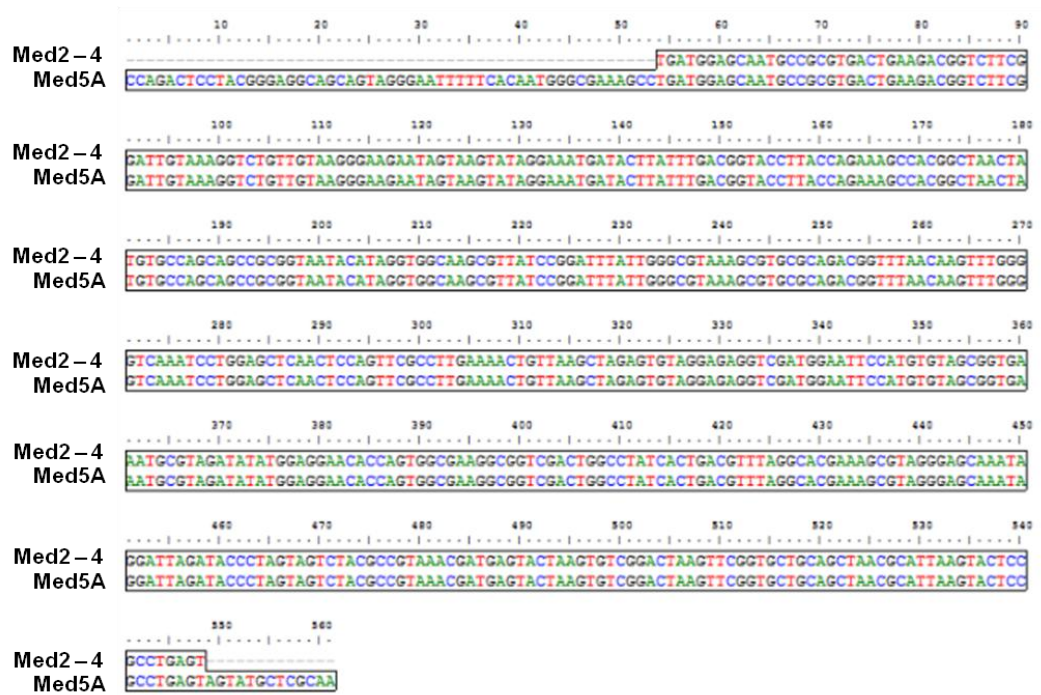


Figura III-23: Alineamiento de la secuencia parcial del gen ARNr 16S amplificado con los cebadores indicados por Spersger y colaboradores (2002) de dos muestras de medusas. Cada una de ellas proviene de un muestreo diferente y son 100% similares.

III.3.2.2.2 Cefalópodos

En la **Tabla III-20** se muestra los resultados de detección de micoplasmas con PCR a tiempo real y el aislamiento a partir de las muestras tomadas de siete pulpos. Se detectó en 7 de las 36 muestras y se aisló en 3 de ellas. Los mollicutes cultivados procedieron todas del mismo animal (el nº 2) y del esófago (PE), glándula digestiva (PG) y estómago (PSt). Los tres aislamientos se clonaron, para poder proceder luego a su análisis. Sin embargo, el aislamiento PSt no pudo ser analizado debido a que su cultivo no estaba puro sino mezclado con otra(s) especie(s) de bacteria(s), a pesar de haberse

filtrado el cultivo. En la **Figura III-24** se puede observar colonias de la cepa de micoplasma Myc-PULPO aislada de esófago.

Tabla III-20: Resultados de las muestras obtenidas de pulpo. El primer número indica el muestreo en el cual fue obtenido el ejemplar y el segundo, su número individual. √: muestras positivas a la presencia de mollicutes, determinada mediante una PCR a tiempo real específica para la clase *Mollicutes* basada en un fragmento del gen ARNr 16S, adaptada de Van Kuppeveld y colaboradores (1992); X: muestras negativas a la presencia de mollicutes; -: Porción corporal no muestreada

| Porción corporal muestreada | Ejemplares muestreados | | | | | | | Nº total |
|--------------------------------|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----------|
| | 1.1 | 1.2 | 1.3 | 2.1 | 3.1 | 3.2 | 3.3 | |
| Branquias | X | X | X | X | X | X | X | 7 |
| Esófago | X | X | X | √ | X | X | X | 7 |
| Estómago | - | - | - | √ | X | √ | X | 4 |
| Glándula digestiva | X | X | X | √ | X | X | X | 7 |
| Intestino | - | - | - | X | - | - | - | 1 |
| Testículos | - | - | - | X | - | - | - | 1 |
| Sifón | - | - | - | - | X | X | X | 3 |
| Ojos | - | - | - | - | X | √ | √ | 3 |
| Total: 33 | | | | | | | | |

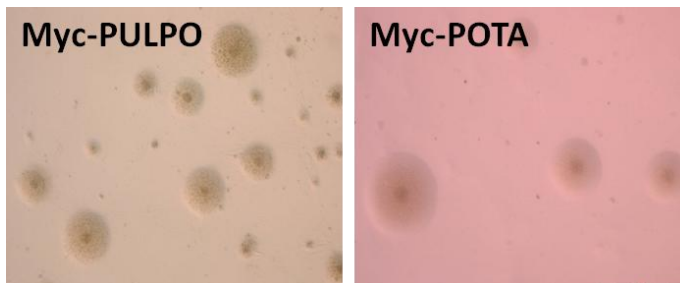


Figura III-24: Colonias de los mollicutes encontrados muestras tomadas en esófago (PE) de pulpo (*Octopus vulgaris*) (Myc-PULPO); y en branquias (5H) de pota (*Todarodes sagittatus*) (Myc-POTA). 40X.

En los dos ejemplares de pota analizados también fue verificada la presencia de mollicutes, en las branquias de uno de ellos (5H) y en branquias (6H) e intestino (7H) del otro. De tres muestras analizadas se aislaron micoplasmas en las tres. En la **Figura III-24** se puede observar colonias de la cepa 5H de Myc-POTA.

A través de la ISR fue confirmado que las dos cepas de Myc-PULPO tienen el mismo tamaño de producto de PCR y lo mismo ocurrió con las tres cepas de Myc-POTA. El tamaño de producto de la ISR de Myc-PULPO fue ligeramente mayor que la ISR de las tres cepas de Myc-POTA. Fue posible observar que los productos de ISR de PSt eran varios tamaños confirmándose así que estaba contaminado y no crecía en él sólo micoplasmas (**Figura III-25**).

A través de la secuencia de la ISR se confirmó que los aislamientos PE y PG de Myc-PULPO eran iguales entre ellos (similitud de 100%). Los tres aislamientos Myc-POTA (5H, 6H y 7H) también dieron un 100% de similitud entre ellos (**Figura III-26**), mientras que su similitud con la ISR de Myc-PULPO fue del 72,1% (**Figura III-27**).

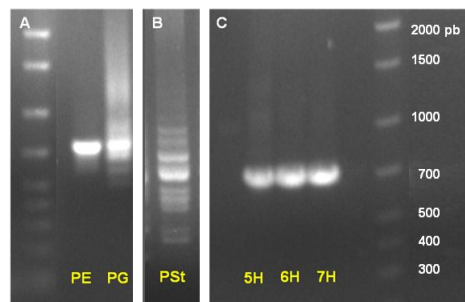


Figura III-25: Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos de PCR de la ISR. En el gel A y B se encuentran las muestras de esófago (**PE**) y glándula digestiva (**PG**), y de estómago (**PSt**), respectivamente, de un ejemplar de pulpo común (*Octopus vulgaris*). En el gel C se observan las muestras de branquias (**5H**) y en branquias (**6H**) e intestino (**7H**) de dos ejemplares de pota (*Todarodes sagittatus*). El marcador molecular de los gels A y B es el mismo. El gel B se rige por el marcador molecular del gel C.

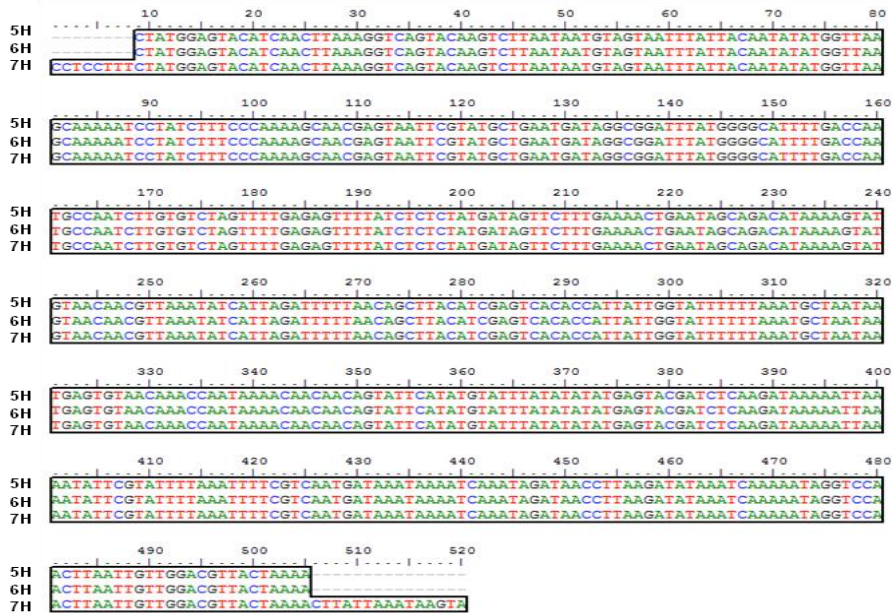


Figura III-26: Alineamiento de la secuencia de la ISR de las tres muestras de pota **5H** (branquias), **6H** (branquias) y **7H** (intestino) provenientes de las proximidades de la isla canaria de “El Hierro” donde fueron aislados mollicutes. Su similitud es del 100%, por lo que la especie de las tres muestras es denominada genéricamente como *Myc-POTA*.

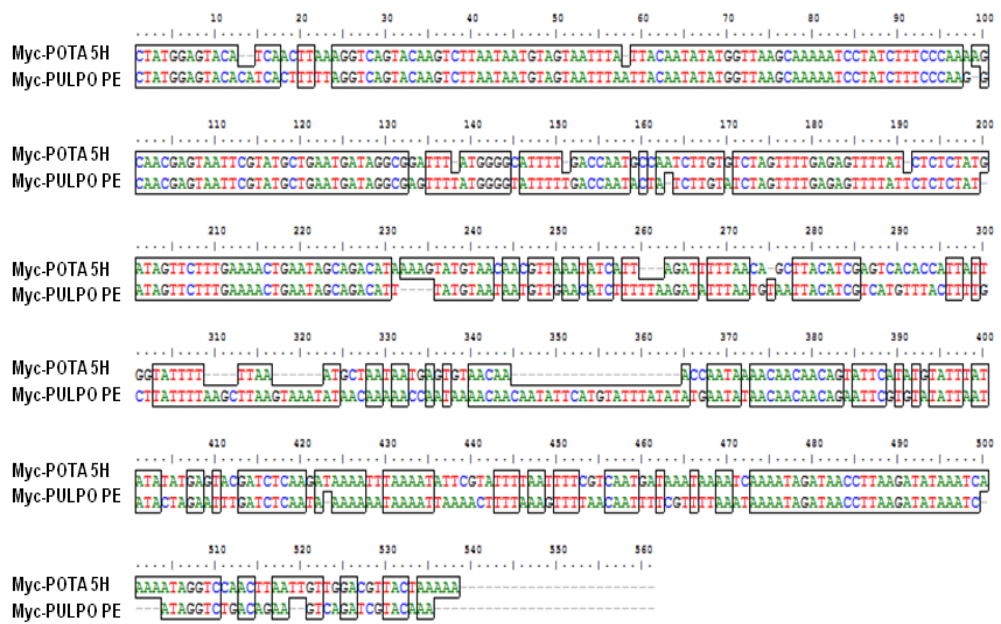


Figura III-27: Alineamiento de la secuencia de la ISR de Myc-POTA 5H y Myc-PULPO PE. Su similitud es del 72,1%.

Al realizar el *BLAST search* de las secuencias de las ISR de Myc-PULPO y Myc-POTA se observó que sólo se calcularon los porcentajes de similitud con un 16-18% de la secuencia, dando Myc-PULPO una similitud del 85% con *Mycoplasma spumans* (AY762642.1) y Myc-POTA un 73% con *M. conjunctivae* (FM-864216.2). La similitud de la ISR entre las cepas 5H de Myc-POTA y PE de Myc-PULPO es del 72,1%. Los fragmentos de secuencias se corresponden con dos zonas conservativas de la ISR, Box A y Box B. En la **Figura III-28** se puede observar el cromatograma de la parte de la secuencia de Myc-POTA analizada por la aplicación *BLASTn*. Debajo se muestra un alineamiento de parte de la secuencia ISR de micoplasmas aviáres donde pueden observarse dichas zonas.

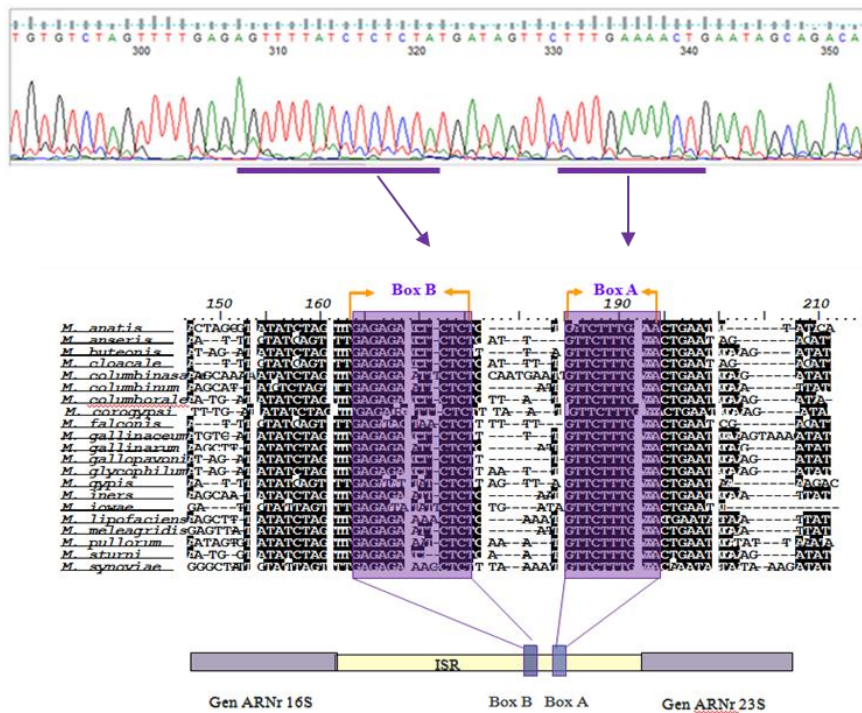


Figura III-28: Cromatograma de la parte de la secuencia de Myc-POTA analizada por la aplicación *BLASTn*. Este fragmento de la secuencia se corresponde con dos zonas conservativas de la ISR, Box A y Box B. Debajo se muestra un alineamiento de parte de la secuencia ISR de micoplasmas aviarios donde pueden observarse dichas zonas.

La secuencia del gen ARNr 16S se obtuvo para la cepa PE y su *BLAST search* dio como resultado una similitud del 88% con *Mycoplasma molare* (NR_041931.1), así como con otros micoplasmas relacionados. También se secuenció el gen ARNr 23S, mostrando un 96,6% de similitud entre ambas especies. La secuencia completa de los genes ARNr 16S y 23S de la cepa Myc-PULPO (PE), además de su ISR se encuentran en la **Tabla III-21**. El análisis de la secuencia incompleta del operón ARNr dio como resultado una similitud del 87% con *M. mobile* y *M. pulmonis*, entre otros.

La secuencia del gen ARNr 16S se obtuvo para las cepas 5H y 6H, dando una similitud del 100% entre ellas **Figura III-29**. Mientras que su *BLAST search* dio como resultado una similitud del 87% con *Mycoplasma molare* (NR_041931.1), como con otros micoplasmas relacionados. También se secuenció el gen ARNr 23S. La secuencia completa de los genes ARNr 16S y 23S de la cepa Myc-POTA (5H), así como su ISR e ISR2 se encuentran en la **Tabla III-22**. El análisis de la secuencia incompleta del operón ARNr dio como resultado una similitud del 87% con dos cepas de *M. crocodyli* y *M. mobile*, entre otros.

En la **Figura III-30** se puede observar el alineamiento de las secuencias del gen ARNr 16S de las cepas PE y 5H de Myc-PULPO y Myc-POTA, respectivamente. La comparación entre las secuencias dio un porcentaje de similitud del 98,6%. Al comparar las secuencias que incluían los genes ARNr 16S y 23S además la ISR y parte de la ISR2, la similitud disminuyó a 94,4%. Hay que destacar que Myc-POTA presenta una región intergénica entre los genes ARNr 23S y 5S, sin embargo, Myc-PULPO no tendría el gen ARNr 5S a continuación del 23S, por lo que no existe una región intergénica propiamente tal (**Figura III-31**). La longitud de las secuencias conseguidas fue de 5.298 pares de bases para Myc-POTA y de 5.035 para Myc-PULPO.

Tabla III-21: Secuencia del gen ARNr 16S, ISR y gen ARNr 23S de Myc-PULPO PE proveniente de pulpo (*Octopus vulgaris*) y su porcentaje de similitud con otras especies.

CTGGCTCAGGATGAACGC TGGCTGTGTGCC TAAACATGTCATGTTGAACGAAGCTAAAGTGCTTGCAC TTTAAGAC TTAGTAGCGAATGGGTGAGTAACAC
GTACTTAACC TACCCCAAGTTTGGGATAACGTTTGGAAACGAACGC TAAACCCGAATCGTATTGAAATCGCATGATTTAAATA TAAAGGAGCTTCGGCTT
CGCTAGGGGATGGGAGTGCCTACATTAGTTAGTTGGTAGGGTAATGGCCACCAGACTATGATGTA TAGCGGGCCGAGAGGC TGA TCCGCCACACTG
GGAC TGAATACGGCCAGACTCC TACGGGAGGACGATAGGGAAATTTCC CACAATGAACGAAAGTTT GATGGAGCGACACAGCGTGCGAGGATGAAAGT
CTTCGGATCGTAACTGCTGTATAAGGGAAGAAAACTCTAGTAGGTAATGACTAGAACTTACGGGTACCTTATCAGAAAGCGACGGCTAACTATGTGCCA
GCAGCCCGGGTAATACATAGGTCGCAAGCGTTATCCGGAAATTTGGGCGTAAAGAGTTCGTAGGTGGCTTGTGCTGAAAGTTAAAGCCCGGGCTCA
ACCCCGGCCCGCTTTGGATAGTCAAGACTAGAGTA TTAGAGAGGTTAGTGGAACTCC AAGTGAAGCGGTGGAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACCAAT
GGCGAAGGCAACTAAGTGGCTAACTGACACTGAGGAACGAAAGCGTGGTAGCAAA CAGGATTAGATACCC TGTAGTCCACGC TGTAAACGATGATC
ACTAGACGGTAGAGGATTTACTGTACAGCTAACGCTAATAGTGA TCCGCCCTGAGTAGTATGC TCGCAAGAGTGAAGCTTAAAGGAA TTAGCGGGGACCG
CACAAAGCGGTGGAGCATGGTTTAAATTTGAAGATACGCGGAGAACCTTACCACCT TTAGACATCTTCCGCAAGCTATGGAGACATAGTGGAGTTAAG
GAATGACAGATGGTGCATGGTTGCTCAGCTCTGTCTGTGAGATGTTCCGGTAAAGTCCGGCAACGAGCGCAACCCCTGTCC TTAGTACCAGCACGTAGT
GGTGGGACTCTAGGGAGACTGCC TGGTAAACCAGGAGGAAAGTGGG GACGACGTC AAATCATGCTCTTACGAGTGGGGCAACACAGCTGC TACA
TGGGAGATACAGAATGACGCAATATGGTGACA TGGAGCAATCAAAAAATCTCTCA GTTCGGATCGAAGCTGCAAC TCGACTTGTGGAAGTTGGAAAT
GCTAGTAACTGTAGGTCAGCTATAC TACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTTGACACACCGCCGCTCACACACCGGGAGC TGTAA TGGCCGAAAGCTGGTTT
ATTAAC TTCGGAGTGCATGTCTAAGGCAGGACCGGTGACTGGGGTGAAGTCTGTAACAAGGTATCCCTACGAGAACGTGGGGATGGATCACCTCTTTCTA
TGGAGTACACATCACTTTTAGTGCAGTACAAGCTCTAA TAA TGTAGTAA TTTAA TACAATA TATGGTTAAGCAAAATCCTATCTTCCAAAGGCAACGAGTA
ATTCGTATGCTGAAATGA TAGCGAGTTT TTAGGGTATTTT GACCAATACATCTTGTATCTAGT TTTTGGAGT TTTA TCTCTATA TAGATCTTTGAAAA
TGAATAGCAGACATTTATGTAATAGTGAACATCTTTTAAAGA TATTAATG TAA TACATCGTCA TGT TTTACTTTTCTTATTTTAAAGCTTAAAGTAAATAAAC
AAAAACCAATAAACCAATA TCA TGTATTTATA TGAATA TAACAACACAGAAATTCGTGATA TTAATA TAC TAGAATTTGA TCTCAA TAAAAATAAAA
TAAAACTTTTAAAGTTT TAAACAAATTTTCGTTT TAAATAAGATAAACCTTAAAGATA TAAATCA TAGGCTGACATTAAGTCAGATCGACTGTTACAAACTTATAAAA
TAAGTAAGAGTGAAGTGTGAA TGCC TGGGCT TGGAACTGATGAAGGAGCTGA TACCTCGATAGCAATTGGGAGCTGGA TATACGCTATGAAACAAAT
GATTTCCGAA TGGGGAACCCAGCTGGAT TAA TCTCCA GTTACTCCAAC TGAATACATAGGTTGGGTAGAGATATACCTTGTGAAC TGAACATCTTTAGTAG
CAAGAGGAAAA GAAAAATAATGATTTCCGTAGTGCAGGCGGAGCGAACCGCGAAGAGGCAAAACACAGCTTTTAGCTGGGGTGTAGGACAGCTTTTATG
AGTTACAAAACTTAGTATAGAA GAA TACCTGGAAGGTAAAGCAAGAGGGGTAGTCCCGTACTTGAATGCA TAAAGACTTTAGCTGTATCTCGTAGTA
GGCCGGGACAGTGAACCC TGT TTTGAATCCCGGGGACCAACCGGTAAAGCTTAA TACTAACAGACACCGATAGTGAACAAAGTACCCTGGAGGAAAGG
TGA AAAAGAACCCGTGAGGGGAGTGAATAGAT TCTGA AACCGCTTACTTCAAGTGT CAGAGCCCTTAA TGGGTGATGGGTGATGAGTATGGT
CCGGCGATTA TGTTCGCTGCAAGGTTAAGTGGAAAAAGCGGAGCCGTAGAGAAATCGAGCTTAA TAGGGCCCGCAGTACGTAGATA TAGACCCGAAA
CCAGGTGATCTATCCATGAGCAGGC TGAACGTTAGG TAA TACTAACTGGAGGGCGGAA CAGAGTACGCTGAAAAGTGC TGGATGACTTTGGATAGCGG
TGAAATTCCAA TCGAACCTGGATA TAGCTGGTCTCTTCGAAATAGCTTTACGGCTAGCGTTGTG TGTAAAGTAG TGGAGGTA GAGCAGTGAATGGGATG
GCCCGCC TACGGGTACTGACTACA TTAAC TCCGAATGCCATTA TGTATTGACAGCAGTCAAGAAC TGGGTGA TAACTGCTCATGCTGCCGAGGGAAA
CAACCCAGATCTCAGCTAAGGTCC TAAATTTGTTAAGTGAAGAAAGTTG TGGGTTTCACAAACAGCTAGTATGTTGGCTTAGAAGCAGGCAATTTTA
AAGAGTCGCTAACAGCTCAGTCAAGAGACCC TGC CCAATAATGTAACGGGACTAAACCAATACCAGAGCTACGGACTTCCATTTATGGGAGTGGTA
GGAGAGCGTTC TTGTCAGCACTGAAGTCAGACCGTGTAGACTGTGGAGCGCAAGAAAGTGAAGTGC CCGAA TGAATGATGATGAAAGTTGAAAGTTGCA
TCACGCC TATTGGGGAAGTTCCTGGGCAAGGTTCTGCCACCCAGGGTTAGTCCGGACCTAAGGCGAGGCGGAA TGGGTAGTGCATGGACAACAGGTT
GATATTCCTGTACTTCGCTAGAGTGA TGGAGTGCAGGAGAAAGGATAATACTACCAC TTAATGGATTGTGGGTAAAGCAGTAAGAGGGTCAAGTAGGCAAA
CCGCTTGTATTTAACTT GAGCTGTGACGCATA GGGAAAGCTTCGGCGA TTACCGAA TTTGTA TGA TTTCA TGC TCCAAAGAAAAGCTTCAACTTTAATCTA
GTTGGAACCCGTACCGAGAACGACACAGCTCC CCAAGATGAGTATCTTAAGGC GAGCGAGATAACCA TTTGTTAAGGAAC TCTGCAAAATGACCCCGTAA
TTAGCGAGAAAGGGTGTCTCATATAAGACAA TTTATTTGTAATAAGTGAAGCGCCGACTGAAAAGTGAAGGGGCGACTGTTTACAAAACACAGCTTTGTGCTAA
ATCGCAAGATGAAGTATACGAGGTGACGCTGCCAGCTGCCGAGGTTAAGTTGAAGTGTAGCATTAGC GAAGCTCTGATATGAAGCCCGGGTGAACCGG
CGCCGTAACTATAACGGTCC TAAAGTACGATAATTTCTTGTCCGCTAATTAACCGACTGACGAAAGGCGTAAACGATCTCAGCTGTCTCAACACCGGC
CTC GGTGAAATATAGG TACCAGTAAACGCTGGTTACCCGCA TCAAGACGAAAAGACCCGTGGAGCTTACTACAGG TTTGTTATTGTTATTGGCTAAA
CATGTGTAGGATAGGTGGGAGACTTTGAAACTTGGACGCTAGTCTAAGTGGAGTCACTCTTGAATACCACCCCTGTTTAGTGTGAATAACTAACTTGCACCA
TTA TCTGTGGGGAG GACATGCTATGCTGGGTAGTTT GACTGGGGCGGCTGCC TCC TAAATG TAGCGGAGGGCGCTCAAAGATACCCCTCAGTACGGTCA
AACCCTACGATAGCGCAAGG TAAAGGGGTGTTT GACTGTGAGACC TACAAGTCGAGCAGGTGCGAAAAGCAGGACTTATGATGATCCGGCGGTCC TGTG
GAAGGGCCGCTGCTCAACGGATAAAAGCTACCCCGGGGATAACAGGCTTATCTTCCCAAGAGATCACATCGACGGGAAGGTTTGGCACCTCGATGCTGG
CTCATGCACTCTGGAGCTGGAGTCTGGTTCCAAGGGTTGGGCTGTTCGCCCATTAAGCGGTACGCGAGCTGGGTTCAGAACGCTGTGAGACAG TTTGGT
CCCTATGATGTGGGCGTTGGATTATTGATGAGAGCTGCTT TTAGTACGAGAGGACCGGAGTGGACATACCACTGGTGTTCAGTTTCCCGGCCAGGGGG
ATAGCTGGTAGCCAAGTATGGAAA GATAACCGCTGAAAGCATCTAAGC GGGAAAGCCCTCAGAGATGAA TAACTCC TTTGAAATCTCTGTAGACGACG
AGGTTGATAGGC TGAAGTGTACGCTGAGCGATACATTTAGCTGACAGTACTAATAA TGAACGGTTTAAAGTGAATCTATA TTTAGGTTATCTATTTAA
ACGGTAGCTCACAACAATACCCAAACAAACAATCTAATATTGAGTTT

| | |
|--------------------------|---|
| Similitud ¹ : | 87% <i>Mycoplasma mobile</i> 163K AE017308.1 |
| | 87% <i>Mycoplasma mobile</i> 163K strain 163K NR_076218.1 |
| | 87% <i>Mycoplasma pulmonis</i> (strain UAB CTIP) AL445565.1 |

¹La similitud fue obtenida comparando las secuencias de la base de datos GenBank usando la aplicación BLASTn

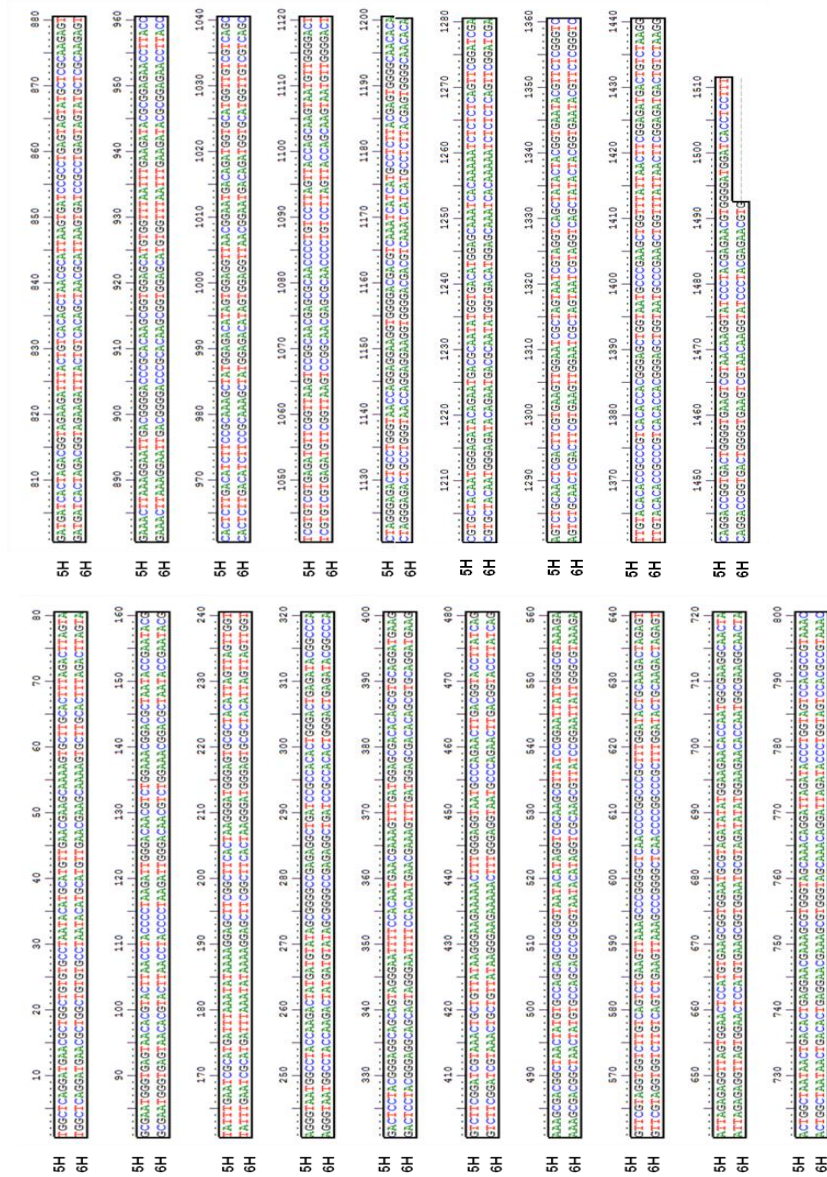


Figura III-29: Alineamiento de la secuencia del gen ARNr 16S entero de dos muestras de pota 5H (branquias) y 6H (branquias). Su similitud es del 100%. Ambas especies fueron denominadas Myc-POTA.

Tabla III-22: Secuencia del gen ARNr 16S, ISR, gen ARNr 23S y ISR2 de *Mycopota* 5H proveniente de *Todarodes sagittatus* y su porcentaje de similitud con otras especies.

TGGCTCAGGATGAACGCTGGCTGTGTGCC TAA TACATGCATG TGAACGAAGCAAAAGTGCTTGAC TTAGAGCTTAGTAGCGAATGGGTGAGTAACACGTA
 CTTAACCTACCC TAAGATTGGGACAACGTC TGAACGGGACGCTAATACCGAA TACGTA TTTGAA TCGCATGATTTAAATAAAAAAGGAC TTCGGCTTCCAC
 TAAAGGGA TGGGAGTGCCTACATTAGTTAGTTGGTAGGGTAATGGCC TACCAAGACTATGATG TATAGCGGGCCGAGAGGC TGA TCCGCCACAC TGGGA
 CTGAGATACGCGCCAGACTCCTACGGGAGGACAGTAGGGAA TTTCCACAATGAACGAAAGTTTGA TGGAGCGACACAGCGTGCA GGATGAAGGCTT
 CGGATCGTAACCTGCTGTTA TAAAGGGAAGAAAACTTTGGGAGGTAATGCCAGA ACTTGACGGTACCTTATCAGAAAGCGACGGCTA ACTATGTGCCAGC
 AGCCGGGG TAA TACA TAGTCTCGCAAGCTTATCCGGAA TTTGGGCGTAAAGAGTTCGTAGGTGGTCTGTG CAGTCTGAAG TTAAGCCGGGGCTCAAC
 CCCGGCCC GC TTTGGATCTGCAAGACTAGAGTATTAGA GAGGTTAGTGGAACTCCA TGTGAAGCGGTGGAA TGC GTAGATATATGGAAGAACCAATGG
 CGAAGCACTA ACTTGC TAA TACG TGA CAC TGA GGAAC GAAAGCGTGGGTA CCAACAGGATTA GATACCC TGGTAGTCCAGGCC TAAACGTA TGA TCA C
 TAGACGGTAGAAGA TTTACTG TCA CAGC TAA CCA TTAAGTGA TCCGCC TGA GTAG TATGCTCGCAAGAGTGA AACTTAAAGGAA TTAGCGGGACCCGCA
 CAAGCGGTGAGCATGSG TTTAA TTTGAAGA TACGGCGGAGAACCTTACC CACTTGCATCTCCGCAAAGCTATB GAGACATAGTGGAGTTAACGGGA
 ATGACAGATGGTGCATGSG TTTGCTGTCAGCTGCTGTCGTGAGATG TCGGTTAAGTCCGGCAACGAGCGCAACCCCTGCTCTTAGTTACCAGCAAGTAATGT
 TGGGGACTCTGAGGAGACTGCCTGGGTAACAGGAGGAAAGTTGGGGACGACGTC AATCA TCA TGCCTTTAC GAGTGGGGCAACA CACGTGCTACAA TG
 GGAGATACAGAATGACCGAAATAGTGGATGACGTGAGGCAATCA CAAAAATCTCTCTCAGTTCGGATCGAAGCTCGCAACTGACTCTGGAAGTTGGAATCGC
 TAGTAA TCGTAGGTCAGCTATAC TACGG TGAATACGTTCTCGGGCTTTGACACACCGCCGTCACACACCGGGA GCTGGTAA TGC GCGGAAAGCTGGTTAT
 AACTTCGGAGATGACTGTCTAAGCGAGGACCGG TGA C TGGGG TGAAGTCG TAA CAAAGGTA TCCCTACGAGAACC TGGGGATGGA TCA CACTCTTTCTATGG
 AGTACA TCAACTTAAAGGTCAGTACAAGCTTAA TAA TGTAGTAA TTTA TTA CAA TATATG TTTAAGCAAAAATCC TATCTTTCCCAAAGCAACGAGTAATTCG
 TATGCTGAA TGA TGGCGGATTTA TGGGGCA TTTGACCAA TGCCAA TCTTGTCTAGTTTGAAG TTTTATCTCTCTATGATAGTCTTTTGA AAAACTGAA T
 AGCAGACATAAAGTATGTAACAA CGTTAAATATCATTAGATTTTAA CAGCTTACATC GAGTCACACCA TTA TGGTATTTTAAATGCTAATAATGAGTGA
 ACAACCAATAAACAACAACAGTATT CATATG TATTTA TATATA TGA GTACGATCTCAAGATAAAATTTAAATATCTGATTTAAATTTTCGCTATGATAAA T
 AAAATCAAAA TAGATAACTTAAAGATA TAAATCAAAAATAGGTC CAACTTAA TTTGTTGGAGCTTAACTAAACTTATAAATAAGTAAGAGTGA GTGGTGAATG
 CTTGGGCTGGAAGTCGAAGAGGAGCGTGTACTTACCTGCGA TAAAGCATGTTGGAGCTGGGATACGCTA TGA AACAATGATTTCCGAA TGGGGAAACCCGAG
 TAGATTAATCTCTAGTTAC TACCAAC TGAATACATAGGTTGGTCAGAGATACACGCTGTGA ACTGAAACATCTTAGTAGCAGCAGGAAAGAAAA TAAATAAT
 GATCCGTAAGTAGCGGC GAGC GAACCGGGAGGAGGCCAAACCGACTTTAGTCTGGGGTTGTA GGACAG TTTTATGAGTTACAAA ACTTATG CATAGAAG
 AATTACTGGAAAGTAAAGCTA TAGGGTGA TAGCCCCG TAA TCAAAATGCA TGA GACTTAACTGTA TCC TGAGTAGGGCGGGCCAGCTGAAACCCG T
 TCGTAA TCCGCGGGACCCCGGTAAGCTAAA TACTAAC CAGACACGATGTAAGAACAGTACCGTGAAGGAAAGG TGA AAGAACCCCGGAGAGGGGA
 GTGAAATAGATTC TGA AACCCTTACTTACAGTAGTACAGACCCGTTAATGGGTGATGGCTACATTTTGCAGTA TGGTCCGGAGTTATGTTTGGCTGC
 AAGTTAAGTGGAAAGAGCGGAGCCGTAGAGAAA TCGAGTCTTAA TAGGGCAGCTAG TACGTAGACATAGACCCGAAACCAAGTGATCTATCCA TAGCA
 GGTGAACGTTAGGTA AACTAACCCGAGGCCCC GAACCGGGTACGCTA AAAAAAGTCTGGATGACTTTGGATCGCGGTGA AATTC CAATCGAACCTGG
 ATA TAGCTGG TCTCTGAAATAGCTTTACGGCTAGCGTTGGTGTG TAAAGTGG TGGAGGTAGAGCAGTGAATGGAA TGGCCGCCCTAGCGGTACTGA
 CTACAATAA ACTCCGAATGCCATTA TGTATACACAGCAGTCA GAACATGGTGA TAA CGTCACTGCTCCGAGGGAACCAAC CAGATCTGCAGCTAAGG
 TCCCTAAATTTG TTAAGTGA AAGGTTGGGG TTTCA CAACAGCTAGTATG TTTGGCTTGAAGCAGCCA TCA TTTAAAGTGGCTA AAGCTCACTA
 GCTGAGAGACCCTCGCCCAATAA TGTAA CCGGACTCAACCAATACCGAAGCTACGGACTCCA TTTA TGGAGTGGTAGGAGGCGTTC TTTGTCAGCACT
 GAAGCGACCCGTGAGGACTGGTGGAGCGGCAAGAAGTGAAGAA TCCCGGAATGAGTAACGATTAAGG TGA AATCTTCA CCGCTATTTGGGAAAGGTTT
 CCTGGCCAGGTTCTGCCACCCAGGTTAGCTGGGACTTAAAGCGAGGCGGAAAGGCGTATGCTGATGGAACAACAGGTTGA TATCTGCTACTCCGCTAG
 AGTGA TGGAGTGCAGGAGAGGA TAA TACTACACTTAA TGGATTGGGGTAAATAGTAAGATGGTCAAGTAGGCAAACTCCGTTGGCTTAACTTGA GCT
 ATGACGCA TAGGGAAAGCTTCGGCGATACCGAA TTTGTA TGA TTTCA TGC TCCAAAGAAAGCTTCAACATTA TCTAGTTGGAACCCGTACCGGAAGACGG
 ACACACGCTCCCAAAGTAGATTTA TTAGGCGAGCGAGATA AACTTGT TTAAGGAACTCTGCAAAA TGA CCCCCTAC GTTCGCAAGAAAGGGGTGCTCAACT
 CAGTGAAGCGGAGTGAAGG TGAAGGGCGACTGTTTATCAAAAACACAGCTTTGTGCTAAA TCGCAAGATGAAGTATACGAGGTGACGCC TGC CCGAGTGT
 CGAAAGTTAAGTGAAGTGTAGCATTAAGCGAAGCTCTGATA TGAAGCCGGA TGAACGGCGCCGTA ACTATAACGGTCTAAGGTAGCGAAA TTTCTTG
 CTGGCTAATACC GACTGCACGAAAGGCTAAGCTCTCTCACTGCTCTCAACAATGGA CTGGTGA AATTTGTTGACAGTGA AAAAAAGCTGGTTACCCG
 CATCAAGACGAAAA GACCCTGGAGCTTACTACAGGTTCTGATTTGTTA TTTGGCTAAACATG TGTAGGATAGGTGGGAGACTTTGAAAGCTATAACGCTAG
 TTA TAGTGAAGTCACTCTTGA AA TACCACCCTTTGTTAGTTGACTAACTTGCACCACTATTA TGGTGGGAGGACAGTGGCTGCTGGGTAGTTGACTG
 GGGCGCTGCCTCTGAAAATG TAGCGGAGGCGCTCAAAGTACCTCAGTACGGT CAGA AACGTACGCA GAGCGCAAAGGTA AAAAGGTTGCTTACTGT
 GAGACTACAGCTGAGCAGGTGCA AAGCAGGACTTAGTGA TCGCGGCTTCTTTGGAAGGGCGCTGCTCAACGATAAAAGCTACCCGGGGATA
 ACAGGCTTATCTTCCCAAGAGTACATC GACGGAAAGTTTGGCACCTCGATGCTGGCTCATCGCTCC TGGAGCTGGAGTCCGTTCAAGGGTTGGG
 CTTGCTGCCATTA AAGCGGTACGCGAGCTGGG TCCAGAACCTGCTGAGACAGTTCGGTCCC TATCTGATGGGGCTGGATTTATGATGAGAGCTGCTC
 TTAGTACGAGAGACCGGAGTGA CATACTCACTGGTTC CAGTTGCTCCGCA GGGCATA GCTGGGTAGCCAAATG TGAAGGATAA CCGCTGAAAG
 CATCTAAGCGGAAAGCTCTCAGAGATGAATAA TCCCTTGA AATCTCTTAGACGACGAGGTGATAGGCTGGAAAGTACGTGTA GCGCATACATTTAGC
 TGACCA G TACTAATAAA TGAACGGTTAA TAA GTGATCTAAACTCTAGGTTA TCTATTGAAACGGTACGTACAGACAAAACATGAAGAACTGCTATTACG
 TTTGAAAGAACTAGAACA AATGACCTATAAGGCTCTTTTCTTCCCTTTTAAAGGCTAGTACGAGCTTTTGTCACTAAATAG TATAAGAGATGATAAT
 AAAAAACAACAGCTAATAAGG TATCTGTTGTTA TAA GTTTAATAA AATTAATAATAA TCTTCTGTATCA TCA TAAAGTAAATCA TCA GCTATTTCAT
 AAAGATCA TAGAGTAGGACTGCAACAGTGGTCCAGCACTTAAACATGAAATATCA TTTGAGSACTCCAAAGCACTTTTATTAATATCTAT
 AACCCAT

| | |
|-------------------------------|--|
| Similitud¹: | 87% <i>Mycoplasma crocodyli</i> MP145 CP001911.1 |
| | 87% <i>Mycoplasma crocodyli</i> MP145 strain MP145 NR_076737.1 |
| | 87% <i>Mycoplasma mobile</i> 163K AE017308.1 |

¹La similitud fue obtenida comparando las secuencias de la base de datos GenBank usando la aplicación BLASTn

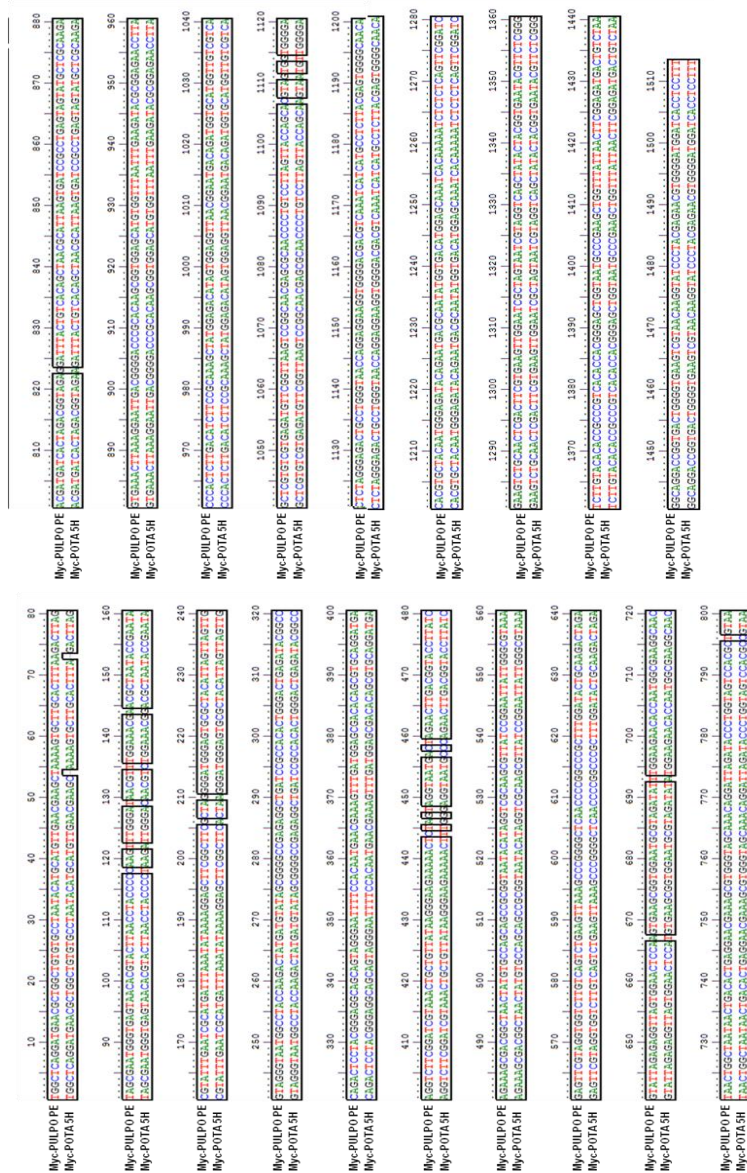


Figura III-30. Alineamiento de la secuencia del gen ARNr 16S entero de Myc-POTA 5H y Myc-PULPO PE. Su similitud es del 98,6 %.

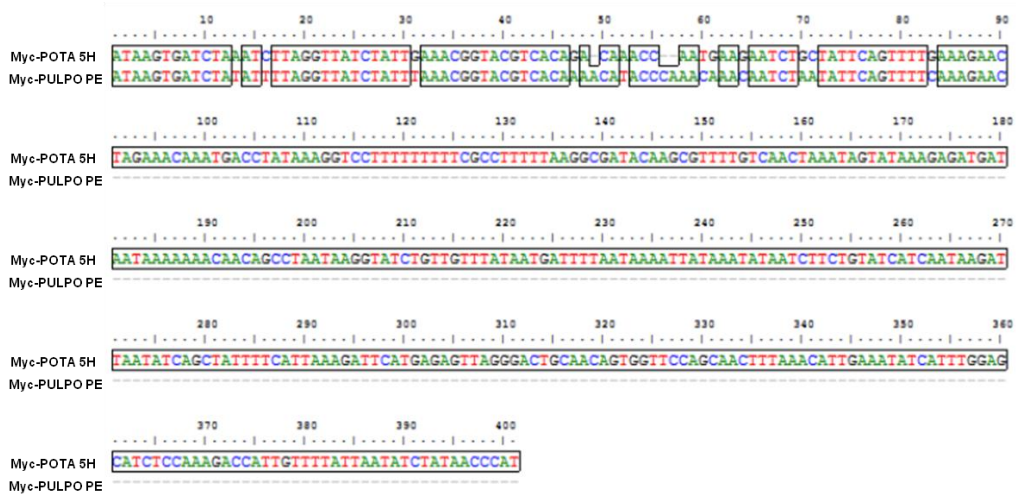


Figura III-31: Alineamiento de la secuencia de la región intergénica entre los genes ARNr 23S y ARNr 5S (ISR2) entre Myc-POTA 5H y Myc-PULPO PE.

Las secuencias del gen ARNr 16S de ambas especies fueron utilizadas para la construcción de árboles filogenéticos, con el objetivo de establecer su grado de parentesco. En la **Figura III-32** se puede observar la posición de Myc-PULPO y Myc-POTA con respecto a representantes de los grupos filogenéticos y en el caso del grupo *M. hominis*, los representantes de sus “clusters” también están incluidos.

El crecimiento en medio de cultivo líquido de las dos especies provenientes de cefalópodos fue verificado a través del aumento de turbidez y su cambio de color, que pasó de rojo a color amarillo. El crecimiento se mantuvo constante en los sucesivos subcultivos en el tiempo. Myc-PULPO y Myc-POTA mostraron un buen crecimiento en placa y colonias típicas de micoplasmas (**Figura III-24**).

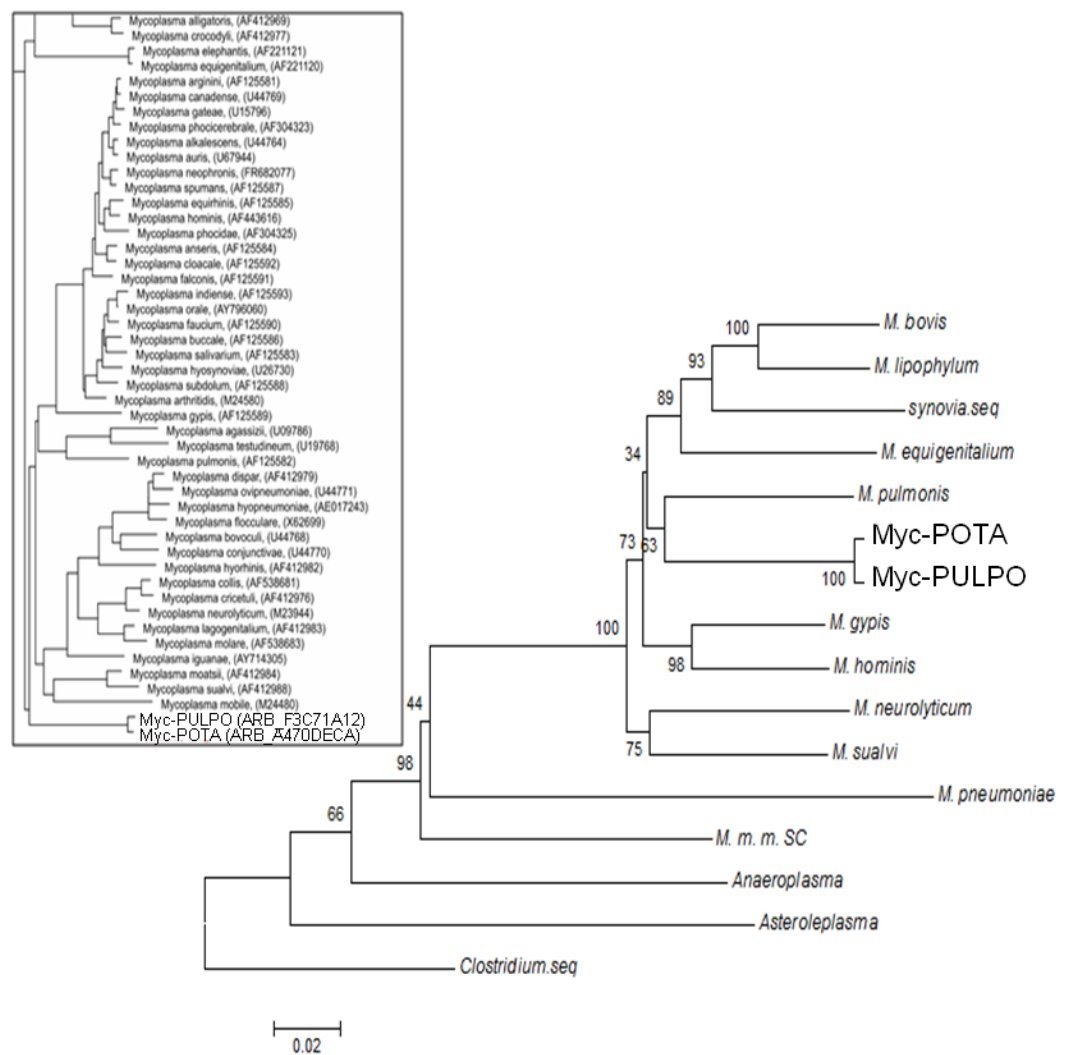


Figura III-32: Árboles filogenéticos en base a las secuencias del gen ARNr 16S y con el método de Neighbor-Joining (1000 replications), donde se muestra la posición de los micoplasmas aislados de cefalópodos Myc-PULPO y Myc-POTA representantes de los grupos filogenéticos y en el caso del grupo *M. hominis*, los representantes de sus “clusters”. En el recuadro se muestra un detalle de las especies más cercanas.

El perfil *DGGE* de Myc-PULPO y Myc-POTA es mostrado en la **Figura III-33**. Se puede observar que el perfil es igual entre las diferentes cepas de Myc-PULPO y entre las de Myc-POTA, pero diferentes entre ellas.

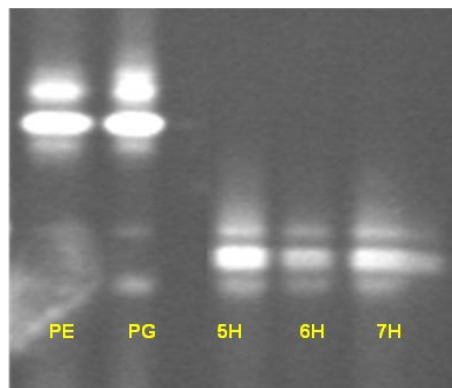


Figura III-33: Electroforesis en gel de *DGGE* de productos de una PCR específica para la clase *Mollicutes* basada en un fragmento del gen ARNr 16S (McAuliffe et al., 2005) provenientes de muestras tomadas en esófago (**PE**) y glándula digestiva (**PG**) de pulpo (*Octopus vulgaris*) (Myc-PULPO); y en branquias (**5H** y **6H**) e intestino (**7H**) de dos potas (*Todarodes sagittatus*) (Myc-POTA).

Su caracterización bioquímica es mostrada en la **Tabla III-23** mientras que su rango de crecimiento, considerando temperatura de cultivo y temperatura vs salinidad del medio de cultivo se puede ver en las **Tabla III-24** y **III-25**, respectivamente. En base a estos resultados el medio de cultivo se reformuló al 3% de sal y la temperatura elegida para aislar micoplasmas de invertebrados pasó de ser 18 °C a 25 °C.

El análisis histológico de las branquias y glándula digestiva de pota no mostró ninguna evidencia de patología o daño celular que pudiese ser atribuido a algún tipo de infección bacteriana o de otra naturaleza (**Anexo V.4.3**).

La **Tabla III-26** muestra el resumen de todas las muestras positivas e identificadas, así como las secuencias utilizadas para la identificación de mollicutes en cada grupo de organismos.

Tabla III-23: Caracterización bioquímica de micoplasmas (Myc-PULPO y Myc-POTA) provenientes de muestras obtenidas en esófago (**PE**) e glándula digestiva (**PG**) de pulpo (*Octopus vulgaris*); y en branquias (**5H** y **6H**) e intestino (**7H**) de dos potas (*Todarodes sagittatus*). **P y C:** Películas y Cristales.

| Especies | Muestra | Pruebas bioquímicas | | | | | |
|-----------|---------|---------------------|--------|----------|------|-------------|-------|
| | | Glucosa | Manosa | Arginina | Urea | Tetrazolium | P y C |
| Myc-PULPO | PE | + | + | - | - | - | - |
| | PG | + | + | - | - | - | - |
| Myc-POTA | 5H | + | + | - | - | - | - |
| | 6H | + | + | + | - | - | - |
| | 7H | + | + | + | - | - | - |

Tabla III-24: Crecimiento a diferentes temperaturas de cultivo de micoplasmas (Myc-PULPO y Myc-POTA) provenientes de muestras obtenidas en esófago (**PE**) de pulpo (*Octopus vulgaris*); y en branquias (**5H**) de pota (*Todarodes sagittatus*).

| Especies | Muestra | Temperatura de cultivo (°C) | | | | | |
|-----------|---------|-----------------------------|----|----|----|----|----|
| | | 4 | 10 | 18 | 25 | 30 | 37 |
| Myc-PULPO | PE | + | + | + | + | - | - |
| Myc-POTA | 5H | + | + | + | + | - | - |

Tabla III-25: Crecimiento a diferentes salinidades y dos temperaturas de cultivo (18 °C y 25 °C) de micoplasmas (Myc-PULPO y Myc-POTA) provenientes de muestras obtenidas en esófago (PE) de pulpo (*Octopus vulgaris*); y en branquias (5H) de pota (*Todarodes sagittatus*).

| Temperatura de cultivo: 18°C | | Salinidades (p/v) | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|---------|-------------------|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|
| Especies | Muestra | 0 | 0,5 | 1 | 1,5 | 2 | 2,5 | 3 | 3,5 | 4 | 4,5 | 5 | 5,5 | 6 |
| Myc-PULPO | PE | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| Myc-POTA | 5H | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |

| Temperatura de cultivo: 25°C | | Salinidades (p/v) | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|---------|-------------------|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|
| Especies | Muestra | 0 | 0,5 | 1 | 1,5 | 2 | 2,5 | 3 | 3,5 | 4 | 4,5 | 5 | 5,5 | 6 |
| Myc-PULPO | PE | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| Myc-POTA | 5H | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - |

Tabla III-26: Número de muestras analizadas (total, de positivas e identificadas) por cada grupo y la secuencia utilizada para la identificación específica de mollicutes en ellas.

| Grupos | Nº de muestras ^a | | | Secuencia utilizada en la identificación específica de mollicutes | | | | |
|--------------|-----------------------------|------------------------|---------------|---|---|----------|----------|----------|
| | Totales | Positivas ^b | Identificadas | ISR | Fragmento del gen ARNr 16S ^c | ARNr 16S | ARNr 23S | ISR2 |
| Cetáceos | 432 | 32 | 11 | 7 | 4 | 2 | - | - |
| Pinnípedos | 80 | 56 | 56 | 56 | - | - | - | - |
| Medusas | 12 | 4 | 4 | - | 4 | - | - | - |
| Cefalópodos | 36 | 9 | 5 | 5 | - | 3 | 2 | 2 |
| Peces | 334 | 2 | - | - | - | - | - | - |
| Total | 894 | 103 | 76 | 68 | 8 | 5 | 2 | 2 |

^a Están consideradas todas las muestras cogidas por cada ejemplar.

^b La determinación de las muestras positivas fue mediante una PCR a tiempo real específica para la clase *Mollicutes* basada en un fragmento del gen ARNr 16S, adaptada de Van Kuppeveld y colaboradores (1992).

^c Corresponde al fragmento del gen ARNr 16S amplificado con los cebadores indicados por Sperser y colaboradores (2002).

III.4 DISCUSIÓN

III.4.1 DE LA METODOLOGÍA EMPLEADA

La metodología de trabajo fue adecuada y en concordancia con la utilizada en estudios similares de detección de mollicutes en organismos acuáticos (ver Sección I.3.4 “Mollicutes y organismos acuáticos”). El detalle del crecimiento y cultivo de las especies trabajadas aquí será detallado más adelante, sin embargo se puede decir que fue posible detectar mollicutes en el 11,5% de las muestras (103 muestras positivas de un total de 894), aunque no cultivar todas ellas, algo que también ha sido descrito en trabajos similares. La recogida de muestras siempre se efectuó en forma rápida y limpia y el tiempo, temperatura y condiciones de su incubación siempre fueron controlados. La experiencia de nuestro grupo de investigación sirvió en todo momento para tal control y en la toma de decisiones durante todos los procesos de procesamiento y cultivo de las muestras y de detección e identificación de los mollicutes encontrados.

La PCR a tiempo real y los cebadores utilizados se mostraron apropiados para la detección de mollicutes en las muestras de organismos marinos. Basados en las pruebas realizadas para validar el método fue posible verificar que se detectaba su ADN incluso si en la misma muestra había material genético de otras bacterias (ver Capítulo II). El siguiente paso se correspondió con la identificación específica del mollicute detectado. Normalmente la identificación de mollicutes se basa en la secuenciación del gen ARNr 16S (Woese et al., 1980; Johansson et al., 1998). Su ventaja es la gran cantidad de información que hay recogida en bases de datos públicas, aunque como desventaja encontramos que para obtener la secuencia del gen ARNr 16S virtualmente completo (unos 1.500 nucleótidos) necesitamos enviar a secuenciar tres productos de

PCR. Hay que señalar también la aportación del Dr. Dmitriy V. Volokhov (*Center for Biologics Evaluation and Research, Food and Drug Administration, Rockville, U.S.A*) quien tiene varios estudios de mollicutes en mamíferos marinos; que nos sugirió en una comunicación personal el uso del gen de la subunidad β de la ARN polimerasa (*rpo β*) para la caracterización de los mollicutes que detectáramos. Este gen no fue utilizado en esta tesis, aunque no se descarta analizarlo en un futuro, debido a que no hay tantas secuencias de este gen y su longitud es mayor que el gen ARNr 16S, por lo que se necesitarían más productos de PCR para conseguir su secuencia completa. Volokhov también ha utilizado la ISR en la caracterización e identificación de especies de mollicutes (Volokhov et al., 2012). En este estudio se optó como primera opción para la identificación de los mollicutes detectados en los organismos estudiados por secuenciar la ISR, debido a su alta fiabilidad, y a que tales secuencias están disponibles *online* (*BLASTn*) y que sólo es necesario un producto de PCR para obtener su secuencia completa. El inconveniente encontrado en este paso se debió, como vimos en el Capítulo II, a la sensibilidad de la PCR y a la poca cantidad disponible de ADN en muchas de las muestras. Si bien era suficiente para ser detectada por la PCR a tiempo real, no lo era para la obtención de productos amplificados de buena calidad de la ISR por PCR convencional que pudieran ser secuenciados. Por otro lado, a pesar de que cada muestra era filtrada y el medio de crecimiento no era específico de mollicutes, aunque contenía un antibiótico β -lactámico, hubo muestras en las que creció algún otro tipo de bacteria o se detectaba su ADN; lo que se reflejaba en los productos que se amplificaban en esa PCR, debido a que tampoco era específica para mollicutes, conseguía amplificar la ISR de cualquier bacteria (datos no mostrados en los resultados). En tales casos, y debido a la mezcla de productos amplificados de diferentes especies, era imposible obtener un buen producto que pudiera ser secuenciado. Algo similar acontecía con dicha secuencia en los mollicutes del género *Acholeplasma*, que al poseer al menos dos copias de la ISR de diferente tamaño y composición, no pudo ser secuenciada. En ambos casos, ya fuera por tener poco ADN o por tener más de un producto amplificado, se recurrió a la amplificación de un fragmento de 580 pb del gen ARNr 16S, utilizando los cebadores y protocolo PCR específicos para mollicutes recomendado por Spargser y

colaboradores (2002) y cuya sensibilidad y especificidad fue evaluada en el Capítulo II. Como se comprobó, es bastante sensible y conseguía detectar ADN de mollicutes y obtener productos de una calidad razonable que podían ser secuenciados así como se muestra en la **Tabla III-26**. Hubo, sin embargo, y fueron la mayoría, muestras en las cuales no fue posible obtener productos de calidad y no pudieron ser finalmente identificados, aunque sí confirmarse que correspondían a la clase *Mollicutes*. Cuando los resultados fueron interesantes, se disponía de la cantidad de ADN adecuada y fue posible económicamente, se secuenciaron además los genes ARNr 16S y 23S y la ISR2. Las secuencias del gen ARNr 16S se utilizaron para realizar análisis filogenéticos.

Con el propósito de intentar obtener más ADN y así productos amplificados de buena calidad, se utilizó el kit de amplificación de ADN *Illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit* (GE Healthcare Life Sciences), el cual puede copiar genomas enteros (Holbrook et al., 2005). Este kit fue probado en muestras de medusas donde se había detectado una especie de *Spiroplasma*, sin embargo, y a pesar de obtener más cantidad del ADN original a través del kit, no fue posible obtener productos puros de mollicutes,

III.4.2 DE LOS MAMÍFEROS MARINOS ESTUDIADOS

III.4.2.1 Cetáceos

De los 72 ejemplares de cetáceos muestreados, 22 fueron positivos a la presencia de mollicutes. El 7,4% del total de 432 muestras obtenidas fueron positivas y el 34,3% de estas últimas fueron identificadas (**Tabla III-26**). El 63,3% de las muestras positivas fueron tomadas de ejemplares que no habían sido congelados, porcentaje que disminuyó con el aumento del tiempo de congelación, siendo de sólo el 22,7% los positivos de muestras mantenidas en congelación por 2 días; y del 14% restante, de muestras mantenidas en congelación entre 10 días y 2 meses. Estos números mostrarían que la congelación de los ejemplares podría disminuir la probabilidad de detectar e identificar los mollicutes presentes, debido, seguramente, a la destrucción celular durante todo el proceso de congelación y descongelación. No hay que olvidar que

para mantener bacterias en congelación es esencial el uso de algún protector criogénico (inositol, glicerol) para evitar dicho daño. El tiempo de congelación no influyó en la obtención de la cantidad de ADN necesario para obtener buenos productos de PCR e identificar las especies de mollicutes a través de su secuenciación génica, de hecho, no parece haber ningún tipo de relación una vez que fue posible identificar a través de la secuencia de la ISR *Mycoplasma* sp. CSL7529-conjuntiva en la muestra de ano de un delfín común (*Delphinus delphis*) que permaneció congelado un mes. Por el contrario, de algunas muestras que fueron tomadas de ejemplares que no habían sido congelados no se obtuvo la cantidad de ADN suficiente para la obtención de productos de PCR de buena calidad que pudieran ser secuenciados. En cuanto al estado de conservación de los ejemplares muestreados, la mitad de las muestras positivas provino de aquellos definidos como “frescos” (conservando la integridad de los órganos y tejidos) y la otra mitad de aquellos “autolíticos” (en el inicio del proceso de putrefacción con la integridad de los órganos y tejidos disminuida).

El protocolo de recogida de las porciones corporales muestreadas fueron boca, ojo, espiráculo, mama (hembras), pulmones, zona genital (pene, testículos, vulva o útero) y ano, además, en caso de encontrar alguna singularidad o señales de infección también era muestreado el órgano o tejido afectado. Lo más común fue detectar ADN de mollicutes en una sola de las muestras tomadas de cada ejemplar, siendo el sitio más común el pulmón, donde se localizó el 19,3% de las muestras positivas, seguido de las muestras obtenidas en mama (16,1%) y ano (12,9%). El 9,7% de las muestras positivas provinieron de la boca, ojo, espiráculo o vulva; por el contrario, sólo el 3,2% de las muestras positivas provino de oído o articulación. Que el sitio más común donde se detecten mollicutes sean los pulmones concuerda con lo encontrado por Foster y colaboradores (2011) y Mc Laughlin y colaboradores (No publicado, GenBank: FJ233097), quienes trabajando con muestras obtenidas de marsopa común detectaron la mayor parte de los mollicutes en los pulmones de los individuos muestreados, identificando a *M. phocicerebrale* y *Mycoplasma* sp. (GenBank: FJ233098-FJ233100). Por otro lado, en heces de marsopa sin aleta (*Neophocaena phocaenoides*

asiaeorientalis) fueron detectadas dos especies de *Mycoplasma* sp. y 47 secuencias de clones de *Ureaplasma* sp. (Mc Laughlin et al., 2012), indicando supuestamente su presencia en intestino y/o ano, lo que también coincidiría con lo observado en la presente tesis, donde un porcentaje importante de mollicutes fue detectado en muestras de ano. Cabe señalar, adicionalmente, que en el riñón de zifio de Sowerdy (*Mesoplodon bidens*) y de marsopa común fueron detectados micoplasmas, así como también en el bazo de esta última. En el protocolo original de toma de muestras del presente estudio no fueron considerados estas dos porciones como sitios de muestreo, sin embargo, en alguno de los individuos sí fueron tomadas, aunque no fueron positivas a la presencia de mollicutes. Por otra parte Poveda y colaboradores (2009), identificaron *M. opalescens* y *M. phocirhinis* en la vagina y útero, respectivamente, de un delfín de dientes rugosos *Steno bredanensis*, al trabajar con ocho ejemplares varados en las Islas Canarias. El cultivo de ambas especies fue llevada a cabo en un medio PH, y fue posible la observación de colonias así como su identificación a través de la secuencia de su ISR. La presencia de *M. opalescens* se cree que es una contaminación de la sala de necropsias, ya que es un micoplasma que sólo ha sido aislado en perros.

Hubo algunos ejemplares en los que se detectó ADN de mollicutes en más de una de las porciones corporales muestreadas, como en el caso de un delfín mular (*Tursiops truncatus*) que presentó mollicutes en el pulmón, vulva y ano; un cachalote pigmeo (*Kogia breviceps*), en ojo y espiráculo; un cachalote (*Physeter macrocephalus*), en boca y mama, y en un zifio de True (*Mesoplodon mirus*) que presentó *Acholeplasma axanthum* AJ311394 (93% - gen ARNr 16S) en el ojo y pulmón. Sólo en este último caso fue posible verificar que la especie de mollicute detectado en ambos sitios de muestreo era el mismo. En los restantes ejemplares no fue posible determinar si el ADN detectado correspondía a la misma especie en todas las muestras o era de mollicutes diferentes. Esto fue debido a la poca cantidad de ADN obtenido que permitió determinar la presencia de mollicutes pero no fue suficiente para determinar su especie.

En los cetáceos estudiados los sitios más frecuentes donde fueron detectados mollicutes se corresponden con aquellos en que en mamíferos terrestres también son encontrados, por ejemplo, en los pulmones de estos últimos se puede encontrar mollicutes, algunos que son patógenos de rumiantes (Nicholas et al., 2008), porcinos (Poveda, 2012) e, incluso, humanos (Giono-Cerezo et al., 2012). Asimismo, en la mama de rumiantes (Jasper et al., 1987; Darzi et al., 1998) se ha detectado mollicutes que pueden producir mastitis. Por último, son varios los estudios que también localizan mollicutes en el intestino de ratones (Giebel et al., 1990), rumiantes (Awan et al., 2009) y humanos (Rivera-Tapia, 2004), siendo asociados en este último caso con la enfermedad de Crohn (Roediger, 2004). Como se ve, todos pueden estar asociados a enfermedades. En cetáceos no se ha podido aclarar el papel que juegan los mollicutes en la producción de enfermedades.

El estudio anatomopatológico de los cetáceos varados fue llevado a cabo por miembros de la **División de Histología y Patología Animal**, que son quienes considerarán la presencia de los mollicutes detectados en el presente trabajo y la unirán a sus observaciones al momento de estudiar y/o publicar sus hallazgos. De esta manera, será posible hacer una valoración más completa y real de la condición sanitaria de los ejemplares.

Un resultado interesante de analizar es la detección de *Mycoplasma* sp. Phocoena C-264-GEN (97% ISR y 99% gen ARNr 16S) en dos ejemplares adultos de delfín listado (*Stenella coeruleoalba*). En una hembra, el micoplasma fue detectado en la glándula mamaria y vulva; mientras que en un ejemplar macho lo fue en el oído, ojo, pulmón, abertura genital y en la articulación atlanto-occipital con artritis (**Figura III-1C**). El análisis anatomopatológico resultante de las necropsias (**Tabla III-27**) muestra que las diferencias entre ambos ejemplares son principalmente su estado nutricional, bueno en la hembra y pobre en el macho, y la evidente artritis proliferativa en la articulación del macho, sitio donde también se aisló el micoplasma. A pesar de que el papel que puede jugar esta bacteria no está claro es necesario considerar la condición nutricional pobre

que presentó el macho, lo que podría ser un signo de un proceso patológico o una condición de estrés, llevando consecuentemente a una baja respuesta inmune; además, de la artritis proliferativa presente. Ambas condiciones podrían ser factores de riesgo que llevasen a la proliferación del micoplasmas en tantos tejidos del macho. En el caso de la hembra, su buena condición nutricional y estado fisiológico podrían haber impedido una proliferación corporal generalizada, aunque su causa de muerte también fue finalmente por encefalitis. Hay que considerar que algunos micoplasmas pueden actuar como inmunodepresores permitiendo la entrada y desarrollo de otras enfermedades (Weisburg et al., 1989; Neimark et al., 2001), sobre todo cuando el hospedador está sometido a condiciones de estrés (Rosendal, 1988; DaMassa et al., 1992). Por otra parte, se han asociado algunas especies de *Mollicutes* a la producción de artritis en mamíferos terrestres: *M. leachii* en vacas (Hum et al., 2000; Manso-Silván et al., 2009); *M. agalactiae* en caprinos y ovinos (Brown et al., 2010F) o *M. hominis*, *M. fermentans* y *Ureaplasma* spp. en humanos (Brown et al., 2010F; Gwee y Curtis, 2014). En cetáceos, sin embargo, los estudios realizados hasta ahora han asociado la artritis con la presencia de la bacteria gram-negativa *Brucella ceti* (Guzmán-Verri et al., 2012), como por ejemplo, en la articulación escapulo-humeral de un macho juvenil de delfín listado varado en Costa Rica, que presentaba “osteoartritis fibrinopurulenta con infiltración severa del fluido sinovial macrófagos y neutrófilos” (González-Barrientos et al., 2010); en la articulación de un delfín común (*Delphinus delphis*) (Davison et al., 2013); y en la articulación de la aleta de un delfín del Atlántico (*Lagenorhynchus acutus*) que presentaba severas lesiones, y donde esta bacteria estaba presente en una gran concentración (Dagleish et al., 2007). Sería recomendable la realización de estudios que considerasen la identificación en conjunto de mollicutes y *Brucella ceti* para ver si existe alguna relación entre ellas como agentes causantes o asociados a procesos artríticos.

Tabla III-27: Informe de necropsia de dos ejemplares de delfín listado (*Stenella coeruleoalba*) que presentaron *Mycoplasma* sp. Phocoena C-264-GEN (97% ISR y 99% gen ARNr 16S). En la hembra fue detectado en mama y vulva y en macho en el oído, ojo, pulmón, abertura genital y en la articulación de una aleta pectoral con artritis.

| Especie | Sexo ^a | Estado de desarrollo ^b | Estado de conservación ^c | Estado nutricional | Diagnóstico ^d | | |
|--|-------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|--------------------|---|---|---|
| | | | | | Morfológico | Etiológico | Entidad patológica ^d |
| <i>Odontoceti /Delphinidae</i> <i>Stenella coeruleoalba</i> | H | A | Fresco | Bueno | Encefalitis no supurativa severa | Encefalitis de origen infeccioso | Patología no consuntiva de origen natural |
| | M | A | Fresco | Pobre | - Severas hemorragias meningéas. - Encefalitis no supurativa. - Encefalitis granulomatosa. - Artritis proliferativa difusa en la articulación atlanto-occipital. | Encefalitis de origen infeccioso y/o parasitario. | Patología consuntiva de origen natural |

^a Sexo: H= Hembra; M= Macho.

^b Estado de desarrollo: NC= Neonato/Cría; J/S= Juvenil/Subadulto; A= Adulto. La clasificación está basada en el largo corporal total y la apariencia de las gónadas de los ejemplares según Geraci y Lounsbury (1993).

^c Estado de conservación del cuerpo al momento de la toma de muestras. Clasificación basada en Kulken y García-Hartmann (1991).

^d La necropsia, valoración y diagnóstico estuvo a cargo de Unidad de Investigación de Cetáceos, División de Histología y Patología Animal. Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria (Universidad de Las Palmas de Gran Canaria).

III.4.2.2 Pinnípedos de la Antártica

Es la primera vez que se estudia la presencia de mollicutes en pinnípedos de la Antártida. Trabajos realizados anteriormente se han centrado en pinnípedos del hemisferio norte (Geraci et al., 1982; Giebel et al., 1991; Ruhnke y Madoff, 1992; Higgins, 2000; Haulena et al., 2006; Volokhov et al., 2010 y 2011), incluso algunos residentes en el ártico, existiendo sólo un estudio en una especie del hemisferio sur, en el que fueron muestreados ejemplares de lobo marino australiano (Lynch et al., 2011). Como un dato curioso se puede mencionar el trabajo de Franzmann y Rohde (1992) los que describen por primera vez un mollicute aislado en territorio antártico. A través de pruebas bioquímicas de cultivo, fotos de electroscopía electrónica y análisis de ADN, se consiguió describir una bacteria tipo-micoplasma presente en un ecosistema metanogénico en el lago antártico Ace Lake.

Las muestras colectadas en Isla Decepción son originarias de un gran proyecto que considera el estudio de las poblaciones microbianas presentes en pinnípedos antárticos. Fue posible identificar micoplasmas en 56 de las 80 muestras de pinnípedos, identificando seis especies de micoplasmas (MZ, MZD, MC, MM1, MM2 y ML). La mayoría de los ejemplares presentó sólo un tipo de micoplasma, con excepción de dos ejemplares de lobo marino cada uno de los cuales presentó dos tipos de micoplasmas. En la boca de uno de ellos fue detectado *Mycoplasma zalophi* (MZ) mientras que en el otro fue *M. sp. CSL7529-conjunctiva* (MC), y en la vagina de ambos fue detectado *M. zalophidermidis* (MZD).

Solamente MZ fue detectado en las tres especies de pinnípedos muestreadas en el presente estudio, y casi exclusivamente en muestras bucales. Es interesante notar que los restantes resultados muestran una distribución diferenciada entre los micoplasmas y los hospedadores donde fueron identificados. MZD y MC, por ejemplo, fueron detectados exclusivamente en las muestras de vagina de lobo marino, sin aparecer en muestras de foca de Weddell o de elefante marino. Esto podría deberse al menor número de muestras obtenidas de estas dos especies, lo que disminuiría la

probabilidad de detectarlos, sin embargo, cuando se observa el caso inverso, esto es, las especies encontradas en foca de Weddell y elefante marino y no en lobo la explicación podría ser otra. Teóricamente, y debido al mayor número de muestras obtenidas, existiría una mayor probabilidad de encontrar los mollicutes presentes en la especie, con todo, los resultados muestran que *M. sp. Mirounga* ES2805-ORL (MM1), *M. sp. Mirounga* ES2774-NASSP4 (91%-ISR) (MM2) y *M. lipofasciens* ATCC 35015 (78%-ISR) (ML) estuvieron presentes exclusivamente en boca y vagina de foca de Weddell y elefante marino y no en lobo. Tal observación puede llevar a concluir que a pesar de la aparente similitud entre estas tres especies, existiría alguna diferencia a nivel de especie o hasta de familia taxonómica (Otariidae y Phocidae) que influenciaría la distribución de sus respectivos micoplasmas.

Los estudios realizados con pinnípedos del hemisferio norte muestran una distribución similar a la observada aquí: MZD y MC fueron detectados en dos especies de otáridos: en boca y pulmones de lobo marino australiano; no siendo obtenidas muestras de vagina para compararlas con el presente estudio (Lynch et al., 2011) y en boca, fosas nasales y pulmones de león marino californiano (Haulena et al., 2006), y en ninguna especie representante de la familia Phocidae. Por el contrario, MM1 y MM2 han sido detectados exclusivamente en el fócido *Mirounga angustirostris*, el elefante marino del norte y no en Otáridos (Volkhov et al., 2001), coincidiendo con lo observado en la presente investigación. El caso de MZ es diferente, ya que el presente es su primer registro en fócidos, habiendo sido detectado anteriormente solo en otáridos y no en este grupo. Por otra parte, ML fue encontrado sólo en fócidos en el presente estudio, no existiendo registros anteriores de algún micoplasma similar en pinnípedos.

Un detalle adicional e interesante es que los micoplasmas encontrados en ambos hemisferios son los mismos, MZ, MZD, MC, MM1 y MM2 son encontrados en el norte y sur a pesar de la distribución, aislamiento y separación geográfica de sus hospedadores. Esto podría significar que la relación micoplasma-hospedador probablemente es muy antigua, anterior, incluso, a la separación especie específica de

este grupo de mamíferos. No obstante, lo que llama la atención es que en el presente estudio no fueron detectados los micoplasmas más comúnmente encontrados en pinnípedos, *M. phocidae*, *M. phocirhinis* y *M. phocicerebrale* (Giebel et al., 1991; Königsson et al., 2001; Lynch et al., 2011; Volokhov et al., 2011), ni ureaplasmas que también han sido detectados en león y elefante marino del norte (Volokhov et al., 2012B). Tal ausencia no puede ser asociada a ningún factor en especial sino sólo a que el número de muestras es poca como para detectar la presencia de estos mollicutes o a que realmente su distribución no abarca a los pinnípedos antárticos como hospedadores. Llama la atención también que MC haya sido detectado también en una muestra de delfín común, *Delphinus delphis*; debido a que ambos grupos de muestras fueron trabajadas en períodos de tiempo diferentes, no puede asociarse a algún tipo de contaminación cruzada. Foster y colaboradores (2011) identificaron *M. phocicerebrale* en los pulmones de marsopa común, por lo que la aparición de la misma especie en pinnípedos y cetáceos sería posible.

El papel de los mollicutes en pinnípedos no está del todo claro. Por ejemplo, Lynch y colaboradores (2011) indica que el 72% de los ejemplares de lobo marino australiano muestreados tenía en sus fosas nasales tres especies de micoplasmas: *M. phocae*, *Mycoplasma* sp. (GenBank: EU714238) y MZ, los que por encontrarse en individuos sanos y en un porcentaje tan alto fueron considerados como parte de la población bacteriana normal en este pinnípedo. En el presente estudio la especie más frecuente fue MZ, apareciendo en las fosas nasales del 42,5% de los ejemplares muestreados y en la vagina del 2,5%. Sin embargo, este micoplasma también fue encontrado y asociado a la presencia de lesiones subdermales y musculares, así como a artritis y linfadenopatía en ejemplares del león marino californiano (Haulena et al., 2006), y era transmitido teóricamente a través de la mordedura entre los individuos, por lo que si bien puede formar parte de las poblaciones bacterianas residentes, bajo ciertas condiciones, como una laceración que destruye la barrera epidérmica MZ podría comportarse como un agente oportunista y provocar lesiones (Haulena et al., 2006). Adicionalmente, MZD y MC también han sido asociados a daños en león marino

californiano. El primero, a abscesos subdérmicos en ejemplares adultos y el segundo, a posibles abortos debido a su presencia en los pulmones de los fetos, aunque los autores de tal estudio no tenían pruebas concluyentes y solo elucubraban acerca de los efectos sobre el hospedador. Lamentablemente, no tuvimos acceso a información acerca del estado nutricional y/o sanitario de cada pinnípedo, por lo que no pudimos observar ni inferir acerca de la presencia de mollicutes y los posibles efectos sobre su hospedador.

III.4.2.2.1 Uso de la ISR y DGGE

Debido a la gran cantidad de muestras de pinnípedos trabajadas (80) y considerando el alto costo que conllevaría su proceso de identificación a través de secuenciación se pensó en utilizar la ISR para agrupar las muestras y para seguir la identificación solamente con algunos representantes. Las muestras sólo pudieron agruparse en dos grupos, aquellas que en la electroforesis mostraban una banda de un producto amplificado de 300 pb y otra, próxima a 400 pb. Después de secuenciar algunas muestras de ambos grupos se verificó que eran especies de mollicutes diferentes que presentaban el mismo tamaño de banda, por lo que se optó por usar otra parte del genoma para su agrupación. Para esto fue escogida y utilizada la técnica de *DGGE*, basada en un fragmento del gen ARNr 16S. La elección de esta técnica estuvo fundamentada por los trabajos encontrados en bibliografía (Fischer y Lerman, 1983; Muyzer et al., 1993; Lerman y Beldjord, 1999; McIntosh et al., 2008) así como por algunos estudios realizados anteriormente por nuestro grupo, en los cuales fue posible detectar y observar diferencias incluso entre especies de mollicutes muy próximas, debido a su capacidad de separar secuencias que presentan variaciones mínimas. Por ejemplo, a través de esta técnica Suárez-Pérez (2012) consiguió agrupar especies de mollicutes encontrados en aves silvestres, observando un tamaño de banda diferente para cada micoplasma encontrado, permitiéndole la agrupación de las muestras de forma satisfactoria.

En el presente estudio fue posible agrupar en cuatro grupos las muestras de acuerdo al perfil de bandas pero no de diferenciar todas las especies detectadas. MZD, ML y MM1 presentaron bandas a diferentes alturas y patrones bastante fáciles de diferenciar y reconocer. Sin embargo, y a pesar de las diferencias que existen en las secuencias del gen ARNr 16S entre MZ, MC y MM2, el fragmento de este gen utilizado para *DGGE* fue igual entre estas especies. Las tres mostraron un patrón de doble banda con la misma altura y misma separación entre ellas, siendo imposible su diferenciación. Hay que destacar que los autores que describen esta técnica con el par de cebadores utilizados en nuestro estudio, McAuliffe y colaboradores (2005), consiguieron diferenciar por su perfil de bandas *DGGE* tres micoplasmas de pinnípedos: *M. phochirhinis*, *M. phocicerebrale* y *M. phocidae*, sin embargo, se hace evidente que si se quiere aplicar esta técnica en estudios con pinnípedos de la antártica, donde se encuentra otras especies de mollicutes, es necesaria la búsqueda de otro fragmento dentro de este gen u otra región del genoma (gen ARNr 23S, ISR, etc.) que permita una separación clara y simple de las especies a través de la observación de su patrón de bandas.

III.4.3 DE LOS PECES E INVERTEBRADOS MARINOS

III.4.3.1 Peces

De los 112 peces muestreados sólo las muestras de dos ejemplares juveniles de *Sparus aurata* fueron positivas a la PCR a tiempo real específica para mollicutes, con una temperatura de fusión de 86,5 °C; con todo no fue posible aislar ninguno de ellos. Una de las muestras provino de las branquias de una dorada y la otra, del intestino de otra. El producto PCR de la ISR de ambas muestras fue muy débil y no fue adecuado para su secuenciación por lo que se recurrió a los productos amplificados con la PCR y los cebadores MW28 y MW29 señalados por Spersger y colaboradores (2002). En este caso sí se obtuvieron productos amplificados de 580 pb de buena calidad, aunque la secuenciación mostró que el ADN predominante en branquias e intestino era perteneciente a *Vibrio* sp y *Allovibrio* sp, respectivamente. Como parte de la estandarización del método utilizado en la presente tesis fueron realizadas pruebas de

especificidad e sensibilidad de cada par de cebadores. Los utilizados aquí, MW28 y MW29, mostraron ser sensibles a poca cantidad de ADN pero poco específicos, amplificando ADN de otro tipo de bacterias diferentes de mollicutes, como el de *Vibrio anguillarum*. Uniendo esto al hecho de que esta misma especie no es detectada por la PCR a tiempo real (con una temperatura de fusión de 86,5 °C) usada se puede concluir que si bien en ambas muestras sí había ADN de mollicutes, este no era predominante y estaba en bajas concentraciones, razón por la que fue detectada por PCR a tiempo real, pero no por la de la ISR. Finalmente, los cebadores MW consiguieron amplificar el ADN de la bacteria que era más abundante en la muestra pero no el de mollicutes.

Al inicio de las experiencias de la presente tesis fueron utilizados diferentes medios de cultivo específicos para mollicutes, escogiendo el SP4-II como el teóricamente más completo y adecuado para el aislamiento de nuevas especies de mollicutes, basados en que en trabajos anteriores había presentado muy buenos resultados. Basándonos en la literatura utilizamos el medio elegido suplementado con cloruro sódico, a una concentración de 1,5% al inicio (Stanley y Morita, 1968; Román et al., 2012); y de 3% posteriormente, debido al crecimiento y comportamiento de los mollicutes marinos provenientes de pulpo y pota aislados en paralelo en nuestro laboratorio. Sin embargo, y pese a todo lo anterior, no fue posible aislar los mollicutes ni cultivarlos, lo que podría ser debido a que el medio SP4-II no cubre los requerimientos esenciales para este tipo de mollicutes. Hasta ahora sólo se sabe de tres estudios en los que fue posible cultivar mollicutes de peces: dos realizados con peces dulceacuícolas, uno donde fue aislado *M. mobile* a partir de las branquias de tenca (Kirchhoff et al., 1987) y otro donde se aisló un *Mycoplasma* sp. del intestino de tres especies del salmónido *Thymallus* spp. (Sukhanova et al., 2014); y finalmente uno en el que se aisló un mollicute a partir de las branquias del lenguado marino *Microstomus kitt* (Windsor et al., 2010). Este último estudio aún no ha sido publicado aunque sí presentado en un congreso. El medio utilizado fue el medio de micoplasmas comercial de *Mycoplasma Experience* (<http://www.mycoplasma-exp.com/>). En el estudio donde se consiguió aislar *M. mobile*, fueron utilizados varios medios de cultivo, todos suplementados con una fuente de

colesterol (suero bovino, equino u ovino) y un antibiótico β -lactámico (penicilina) para evitar el crecimiento de otras bacterias. Todos los medios utilizados permitieron que creciera el micoplasma siendo el medio Hayflick, Friis y SP4 modificados, y un medio de Urea. El mejor de ellos y que permitió el crecimiento óptimo del micoplasma fue el primero, el medio Hayflick. La composición de este medio es relativamente simple: extracto de levadura, caldo de infusión corazón, suero equino, rojo fenol, penicilina y sal sódica de ADN (heipha Dr. Müller GmbH. Disponible en: <http://www.heipha.com/en-393100>) si es comparada con la del medio SP4-II utilizado aquí (**Anexo V.2.2.2.3**). En el aislamiento de micoplasmas de los salmónidos *Thymallus* sp., también fue utilizado un medio comercial de un kit indicado originalmente para la detección y crecimiento de *M. hominis* (Mycoplasma-50, Instituto de Epidemiología y Microbiología Pasteur. Disponible en: <http://www.dntpasteur.ru/7-080102.htm>). Por lo visto, dicho kit fue utilizado sólo para confirmar el crecimiento del micoplasma y su concentración a las 24 h, pero no fue utilizado para continuar con su cultivo, fase de la cual no se da ninguna información. Observando el buen crecimiento de los mollicutes de agua dulce obtenido en medios de cultivo normales de micoplasmas se puede pensar que tal vez las exigencias de nutrientes es diferente para los mollicutes marinos.

Todo lo anterior lleva a pensar en la necesidad de perfeccionar o diseñar un medio de cultivo que pueda ser utilizado con buenos resultados en el cultivo de mollicutes de peces marinos y en general, de organismos acuáticos; basándose en la información disponible en literatura.

III.4.3.2 Invertebrados

III.4.3.2.1 Medusas

El presente es el primer informe de la presencia de spiroplasmas y en general de algún mollicute en medusas. Dentro del phylum *Cnidaria*, al cual pertenece este grupo de organismos, han sido detectados mollicutes sólo en corales, identificándose uno candidato a ser una nueva especie: “*Candidatus Mycoplasma coralicola*”, que se cree es una especie simbiote del coral *Lophelia pertusa* (Neulinger et al., 2008), así como otros en corales de aguas someras de Alaska (Penn et al., 2006) y en el coral *Muricea elongata* (Ranzer et al., No publicado). En estos dos últimos casos no está clara la relación que tienen con los mollicutes detectados. Finalmente, Work y Aeby (2011) sugieren que los mollicutes podrían estar asociados a lesiones encontradas en corales, aunque no hay pruebas de ello y es necesario estudiarlo más a fondo.

En el presente estudio, por PCR fueron detectados mollicutes en cuatro de un total de cinco muestras provenientes de dos muestreos diferentes de la medusa luminiscente *Pelagia nocticula* (Pelagiidae). Por medio de la secuencia de un fragmento del gen ARNr 16S fue posible determinar que todas las muestras positivas correspondían a *Spiroplasma* sp. Inicialmente fueron cultivados en medio de cultivo SP4-II con 1,5% de cloruro sódico, para después utilizar uno con 3% de cloruro sódico, basados en el mejor crecimiento que se obtenía con otros mollicutes marinos. Fue difícil detectar el crecimiento en el medio líquido el cual se observó a través de la turbidez y el sutil cambio de color del medio de cultivo de rojo a naranja rojizo, por lo que la presencia del spiroplasma fue verificada a través de la PCR a tiempo real específica de mollicutes de cada subcultivo realizado. No hubo crecimiento en placa. A pesar de que el spiroplasma creció en líquido, tal crecimiento fue muy lento y difícil de observar. Esto llevó a que, al igual que en las muestras de peces, la cantidad de ADN disponible fuera insuficiente para poder amplificar productos de PCR (de la ISR o gen ARNr 16S completo) con cantidad y calidad adecuadas para su secuenciación. La identificación en este caso fue posible utilizando un fragmento del gen ARNr 16S con los cebadores y

protocolo descrito por Spargser y colaboradores (2002). La falta de ADN suficiente también impidió la determinación del perfil *DGGE* de estos mollicutes.

Debido al crecimiento tan lento no pudo hacerse una caracterización bioquímica de estas especies debido a que el cambio de color de los medios utilizados para esto no era claro. Fue utilizado el medio de cultivo SP4-II el cual permite el crecimiento de casi cualquier tipo de mollicute, y cuyo medio base, el SP4, fue diseñado especialmente para el cultivo de spiroplasmas (Tully et al., 1977). En el medio marino han sido detectados e identificados previamente algunas especies de spiroplasmas, asociados a enfermedades en crustáceos (Wang, 2011), los cuales han podido ser cultivados exitosamente utilizando básicamente medios de cultivo específicos para este grupo: M1D (Williamson y Whitcomb, 1975) o uno general, el R2, ambos sin cloruro sódico o al 2% de cloruro sódico (Whitcomb, 1983; Nunan et al., 2004, 2005; Wang et al., 2005, 2011). El segundo de ellos es similar al medio SP4-II, teniendo entre sus componentes peptona, extracto de levadura, glucosa, almidón además de piruvato de sodio, fosfato diácido de potasio y sulfato de magnesio (Microbiological Media Database. Disponible en: <http://www.mbmdb.com/frontend/display.php?mid=151>), suplementado como es usual en este caso con suero bovino y algún antibiótico β -lactámico. La composición del medio M1D es diferente, pues además de tener los componentes básicos para un medio de cultivo de mollicutes como Bacto PPLO, Triptona y Peptona, glucosa, fructosa, sucrosa, sorbitol, rojo fenol, suero fetal bovino y penicilina, también posee medio Schneider's *Drosophila*, correspondiendo al 52% del volumen total del medio entero (National Institute of Technology and Evaluation, Japón. Disponible en: <http://www.nbrc.nite.go.jp/NBRC2/NBRCMediumDetailServlet?NO=400>). Esta diferencia en la composición debería teóricamente facilitar el crecimiento de los spiroplasmas, que generalmente están asociados a insectos, crustáceos e inclusive plantas (Brown et al., 2010D y 2010E). En general, el crecimiento de spiroplasmas es difícil (*fastidious*) y considerando los diferentes hospedadores que pueden tener, está claro que tendrán diferentes exigencias y no es probable que un medio con una formulación única pueda ser útil para todas las especies. Existen, por ello, varios estudios en que se comparan y/o

se desarrollan medios de cultivo más específicos como el medio LD82, desarrollado para spiroplasmas fitopatógenos (Lee y Davis, 1983), o el H1, para un spiroplasma patógeno de ratón y conejo (Hackett et al., 1987); y los estudios de crecimiento en diferentes medios de especies fitopatógenas (Jones et al., 1977) o asociadas a insectos (Moulder et al., 2002).

Como dato interesante se puede destacar que también ha sido encontrado un *Spiroplasma* sp. en el tracto digestivo del pulpo *Octopus mimus*, sin embargo, sólo fue detectado por la secuenciación de su ADN y no pudo ser cultivado con éxito (Ishihata et al., 2013).

Hasta la fecha de finalización de la presente tesis fueron realizados tres muestreos de ejemplares de *P. nocticula* y uno de carabela portuguesa, *Physalia physalis* del cual no se obtuvo ninguna muestra positiva a la presencia de mollicutes. Actualmente, se ha continuado tomando muestras cada vez que se producen varamientos de alguna de las especies, con el objetivo de conseguir más aislamientos y poder caracterizar e identificar definitivamente las especies de mollicutes presentes. De hecho, se está intentando el aislamiento de mollicutes de una nueva tanda de carabelas portuguesas, se está trabajando con cuatro muestras, cada una de ellas compuesta por 20-30 individuos. En un futuro se plantea la utilización de medios de cultivo diferentes al empleado hasta ahora, para tratar de conseguir un mayor crecimiento de los spiroplasmas aislados.

III.4.3.2.2 Cefalópodos

El presente estudio se corresponde con el primero en que se consigue aislar y cultivar mollicutes provenientes de cefalópodos. Fueron identificadas dos especies de mollicutes: una en las branquias (5H) y en branquias (6H) e intestino (7H) de dos ejemplares de pota (*Todarodes sagittatus*) encontrados muertos en las proximidades de la erupción volcánica submarina cerca de la isla canaria de “El Hierro” en 2011; y otra,

detectada en el esófago (PE), glándula digestiva (PG) y estómago (PSt) de un ejemplar de pulpo común (*Octopus vulgaris*) proveniente de un cultivo experimental. La primera especie fue denominada Myc-POTA y la segunda, Myc-PULPO.

T. sagittatus es una especie de profundidad de relativa importancia comercial que se distribuye desde el océano Ártico hasta el Atlántico oriental, incluyendo el Mar del Norte y el Mediterráneo. Habita normalmente entre los 400-800 m de profundidad, llegando hasta los 2.500 m y migrando a la superficie de noche (Pierce et al., 2010). Los estudios que se han realizado consideran aspectos ecológicos y de pesquería pero no se ha realizado alguno estudiando las poblaciones bacterianas asociadas a esta especie. Por su parte, la distribución del pulpo común abarca el mar Mediterráneo y ambas costas del océano Atlántico, encontrándose hasta en el sur de Brasil, y en Sudáfrica, Senegal e Islas Canarias. Es una especie bentónica que vive cerca de la costa, a no más de 200 m de profundidad (Pierce et al., 2010). Debido a que tiene un gran valor comercial se han realizado diversos estudios relacionados con su ecología, explotación pesquera, cultivo, reproducción, nutrición y patologías, entre otros aspectos, sin embargo, no existen muchos estudios que describan el perfil de poblaciones bacterianas asociadas a él, a no ser algunas patógenas. Se ha asociado *Vibrio lentus* a la aparición de lesiones en los brazos y manto de esta especie, produciendo la pérdida total de piel y la exposición de los músculos, además de colonizar órganos internos y llevar a la muerte del hospedador (Farto et al., 2003). Adicionalmente, se ha identificado bacterias tipo-Rickettsiales como los agentes que producen hipertrofia y necrosis celular en las branquias de este pulpo, así como a *Pseudomonas* sp. y bacterias tipo-Cytophaga como las causantes de daño celular (Castellanos-Martínez y Gestal, 2013). En otros cefalópodos se ha documentado la presencia de poblaciones bacterianas de los géneros *Shewanella*, *Pseudoalteromonas*, *Vibrio*, *Colwellia*, *Cytophaga-Flexibacter*, *Magnetobacterium* y otras α -proteobacterias en el calamar *Loligo pealei* (Barbieri et al., 2001); *Aeromonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Flexibacter Proteus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* y *Vibrio* en el calamar *Lolliguncula brevis*; y de algunas patógenas en dos especies de pulpo: *Vibrio* (V.) *alginolyticus*, *V. damsela*, *Pseudomonas* (P.) *stutzeri* y *Aeromonas caviae*, en

Octopus joubini, y *V. parahaemolyticus*, *V. damsela* y *P. stutzeri* en *O. briareus* (Hanlot et al., 1984). Además, se ha documentado una relación de simbiosis entre el calamar *Euprymna scolopes* y *V. fischeri*, una bacteria que emite luz y que se aloja en el órgano luminiscente del hospedador (Castellanos-Martínez y Gestal, 2013).

Un trabajo interesante y que se destaca es el de Lehata y colaboradores (2013), quienes al estudiar las poblaciones bacterianas del pulpo *O. mimus* en Chile detectaron, a través de la secuenciación de un fragmento del gen ARNr 16S, la presencia de bacterias de las familias Vibrionaceae y Streptococcaceae, y de mollicutes, siendo estos últimos las bacterias predominantes en el tracto digestivo de todos los ejemplares. Fueron identificados cinco tipos de mollicutes, cuatro del género *Mycoplasma*; y un *Spiroplasma*, todos localizados en el tracto digestivo de los pulpos. Lamentablemente, no fue posible cultivar ninguna de estas especies.

En el presente estudio, la metodología utilizada para el aislamiento de mollicutes fue similar para ambos cefalópodos, variando sólo en el origen de las muestras tomadas. En el único muestreo de pota fueron tomadas tres muestras provenientes de dos ejemplares muertos. En el caso de pulpo fueron hechos tres muestreos, tomando muestras de branquias, esófago, estómago, glándula digestiva, intestino, testículos, sifón y/u ojos. Además, el trabajo con ambas especies no fue efectuado de forma paralela: el primer muestreo de pulpo se llevó a cabo un mes antes del de pota, mientras que el segundo y tercero, cuatro y diez meses después, respectivamente. Los ejemplares de pulpo utilizados en el primer muestreo llevaban congelados a -20 °C más de un mes, mientras que los dos restantes fueron de ejemplares frescos sacrificados en el momento de la obtención de las muestras.

Una vez realizada la toma de muestra “por arrastre” los hisopos utilizados fueron inoculados en tubos plásticos estériles conteniendo el medio SP4-II con 1,5% de cloruro sódico e incubados a 18 °C en condiciones anaeróbicas (300 µl de parafina líquida en la superficie del cultivo). Después de 24 h, y al observar un cambio de color del medio, el

cultivo fue filtrado (0,45 μm) en forma estéril a otros tubos con 2 ml del mismo medio anterior y mantenidos nuevamente a 18 °C y en condiciones anaeróbicas hasta detectar un cambio de color que indicara crecimiento bacteriano. Hay que destacar en este punto que tal crecimiento fue muy lento, pasando al menos un mes para que se observase dicho cambio. El medio de cultivo fue cambiando gradualmente de color rojo a amarillo, llamando la atención que primero amarillease el fondo del tubo para luego continuar desde el fondo hacia la superficie del medio. Esto fue una clara indicación del uso de azúcares por parte de la bacteria y de su preferencia por crecer en condiciones anaeróbicas. La turbidez del medio aumentó, aunque siempre se mantuvo levemente transparente, no mostrándose denso y con aspecto lechoso como cuando hay crecimiento de bacterias diferentes a mollicutes (*estas observaciones y cuidados están basados en nuestra experiencia y en trabajos previos realizados por nuestro grupo*). Hay que señalar que en caso de pota las tres muestras tomadas presentaron el referido cambio de color. En el caso de pulpo fue diferente, en las muestras del primer muestreo no fue detectado ningún cambio de color ni indicación de crecimiento bacteriano. Sólo las muestras del segundo muestreo, provenientes de esófago (PE), estómago (PSt) y glándula digestiva (PG) presentaron un cambio de color conspicuo, mientras que las muestras obtenidas en estómago y ojos de dos individuos del tercer muestreo presentaron un cambio, muy sutil, tornando levemente naranja el medio de cultivo. Es necesario recordar que las muestras del primer muestreo provenían de ejemplares congelados, mientras que las otras de ejemplares frescos. Teóricamente, la congelación debería afectar la viabilidad de las bacterias, que podría ser la razón de no haberse observado ningún de crecimiento bacteriano en las muestras del primer muestreo.

Una vez que se observó el cambio de color se procedió a sembrar alícuotas del cultivo en placas de agar del mismo medio de cultivo utilizado. Después de siete días de incubación fue observado el crecimiento de colonias con típica forma de micoplasma (forma de huevo frito) en las tres muestras de pota. Algo similar ocurrió en las muestras de pulpo del segundo muestreo, que presentaron un crecimiento en placa siete (PE) o diez (PG) días después de sembradas. La muestra proveniente de estómago (PSt)

mostró en su inicio un cambio de color y turbidez semejante al producido por el crecimiento de mollicutes, sin embargo, pasado un mes de incubación, el medio líquido adquirió una turbidez lechosa atípica para mollicutes, lo que fue confirmado una vez que fue sembrado en placa y se observó crecimiento de colonias bacterianas diferentes a mollicutes. Las muestras provenientes del tercer muestreo de pulpo fueron sembradas pero nunca fue observado el crecimiento de colonias.

En paralelo a la siembra de placas también fue extraído ADN para la aplicación de la PCR a tiempo real utilizada para la detección de mollicutes. Las tres muestras de pota, 5H, 6H y 7H, así como las de pulpo del segundo (PE, PG y PSt) y tercer muestreo (estómago y ojos de dos individuos) fueron positivas a la presencia de mollicutes. Seguidamente se realizó una PCR convencional para amplificar la ISR y así obtener productos para secuenciar e identificar los mollicutes detectados. Esto fue posible con las muestras 5H, 6H, 7H, PE y PG, obteniendo productos similares entre ellos de aproximadamente 700 pb, de buena calidad y en cantidad adecuada para su secuenciación. Sin embargo, en la muestra PSt, fueron amplificados muchos fragmentos de varios tamaños, debido, con seguridad a la contaminación que presentaba con otras bacterias, razón por la cual fue descartada para los siguientes análisis.

El análisis de la secuencia de la ISR mostró que los tres mollicutes detectados en pota eran la misma especie (100% de similitud) y que ambos mollicutes provenientes de pulpo pertenecían a una única especie, muy cercana con la encontrada en pota (72% de similitud). Fue en este punto que la especie detectada en pota fue denominada Myc-POTA y la de pulpo, Myc-PULPO. Hay que señalar que la secuencia de la ISR de ambas especies es muy diferente de la del resto de los mollicutes conocidos, con quienes sólo presentaron una similitud en las estructuras “Box A” y “Box B” de esta región intergénica (Fig. XX). Estas estructuras tienen una función anti-terminal, evitando finalizaciones prematuras de la transcripción de los genes ARNr y su secuencia es similar en todos los mollicutes (Harasawa et al., 1992). Al comparar nuestras secuencias con las disponibles en la aplicación BLASTn sólo se comparaba el 18% de la secuencia dada y la indicaba

como similar a representantes del género *Mycoplasma*. Sólo después de un análisis detallado de las secuencias fue posible observar que las únicas regiones que la aplicación comparaba con micoplasmas conocidos eran ambas estructuras "Box". Esto indicaba claramente la singularidad de Myc-POTA y Myc-PULPO como especies de un grupo nuevo y desconocido. Hay que recordar que la ISR ha sido utilizada con éxito al momento de establecer relaciones filogenéticas entre microorganismos muy próximos, presentando la ventaja de que al encontrarse entre genes altamente conservados es posible amplificarla en prácticamente cualquier microorganismo utilizando cebadores universales (Rodicio y Mendoza, 2004). Ha sido utilizada inclusive para diferenciar especies que poseen el gen ARNr 16S muy similar, siendo considerado actualmente una herramienta fundamental al momento de caracterizar e identificar estas especies bacterianas (Harasawa, 1996; Ramírez et al., 2006, 2008A, 2011; Rebelo et al., 2011).

A continuación fueron secuenciados los genes ARNr 16S y 23S y la región intergénica entre los genes ARNr 23S y 5S (ISR2). Para la secuenciación del gen ARNr 16S no hubo ninguna dificultad a la hora de amplificar los productos con los cebadores usualmente utilizados en nuestro protocolo de trabajo (Yavari, 2010). La amplificación del gen ARNr 23S, que se realiza por medio de la amplificación de seis fragmentos superpuestos (A, B, C, D, E y F), fue diferente, ya que los productos C y D de Myc-POTA no fueron amplificados con los cebadores utilizados normalmente, por lo que tuvo que recurrirse a la amplificación de fragmentos más largos que abarcaran desde el producto B al E de una vez y mandando a secuenciarlo. Los fragmentos de Myc-PULPO pudieron ser amplificados sin problema, y directamente con los pares de cebadores usuales. El que no hayan servido los cebadores que son usados en casi cualquier especie de micoplasma indica la particularidad de Myc-POTA en este gen y su diferencia con Myc-PULPO. Se ha demostrado que la secuencia del gen ARNr 23S puede ser tan útil como el ARNr 16S como una herramienta en la caracterización taxonómica y filogenética (Ludwig y Schleifer, 1994). Su aplicación para la detección de diferentes géneros bacterianos está siendo incorporada paulatinamente a los protocolos de caracterización genética (Poveda, 2012).

Otro aspecto curioso fue observado cuando se amplificó la ISR2. Los cebadores utilizados para amplificar esta región fueron los desarrollados por Ramírez y colaboradores (2010), uno de ellos localizado en el final del gen ARNr 23S (*forward*) y el otro, al final del gen ARNr 5S (*reverse*). Estos autores presentaron como hipótesis que si con este par de cebadores se conseguía la amplificación de un producto eso sería señal de que el gen ARNr 5S se encontraba posicionado a continuación del gen ARNr 23S; en caso contrario, si no se amplificaba ninguno, indicaría que el gen ARNr 5S estaba localizado en otra región del genoma y no inmediatamente a continuación del 23S. Tal hipótesis fue probada en micoplasmas aviáres y mostró que las especies pertenecientes al grupo *M. pneumoniae* (ver Sección I.3.1.2 “Taxonomía y filogenia”) sí amplificaban un producto que correspondería a la ISR2 y a parte del gen ARNr 5S, sin embargo, aquellas pertenecientes al grupo *M. hominis*, no amplificaban producto ninguno, indicando así que en este grupo el gen ARNr 5S no sería adyacente al 23S. Tal hipótesis y la localización de este gen ARNr 5S de acuerdo al grupo filogenético ha sido confirmada en estudios realizados con diversas especies (Taschke et al., 1986; Chambaud et al., 2001; Jaffe et al., 2004; Calderón-Copete et al., 2009). En nuestras especies se observó que en Myc-POTA fue amplificado el producto correspondiente a la ISR2 y parte del gen ARNr 5S, sin embargo, esto no fue así en Myc-PULPO, mostrando que en esta especie dicho gen no estaría localizado a continuación de los genes ribosómicos 16S y 23S. Esto es muy curioso, considerando la similitud y parecido de ambas especies en el gen ARNr 16S e ISR, además de sus condiciones de crecimiento en cultivo y hospedadores, ya que este resultado situaría estas especies en grupos filogenéticos diferentes, Myc-POTA dentro del grupo *M. pneumoniae* y Myc-PULPO en el grupo *M. hominis*. Todavía no tenemos una explicación para esto, existiendo dos puntos de vista que podrían explicarlo. Podría considerarse el hecho de que realmente ambas especies procedieran de grupos filogenéticos distantes y que por evolución convergente, debido a la adecuación al mismo medio ambiente y condiciones de vida marina en hospedadores similares hayan llegado a ser tan parecidos, un mecanismo que ha sido observado en algunas especies (Thompson et al., 2011; Stern, 2013). La otra explicación, por el contrario, podría ser que ambas especies derivaran de un ancestro común y que ellas fueran parte de los

mollicutes ancestrales que hubieran originado los grupos filogenéticos que conocemos hoy, por lo que serían muy similares, pero variarían en algunos aspectos que con el tiempo hubieran derivado en diferentes grupos de especies. Ambas explicaciones son sólo teóricas y sin pruebas prácticas concretas. Actualmente, hemos enviado a secuenciar el genoma completo de ambas especies, lo que ayudará a comprender mucho más la distribución de sus genes y puede darnos indicios de la posición de estas.

En GenBank están disponibles las secuencias correspondientes a los mollicutes identificados por Lehata y colaboradores (2013) del pulpo *Octopus mimus*, correspondiéndose con fragmentos de diferentes tamaños del gen ARNr 16S. La comparación entre las 14 secuencias disponibles mostró valores de similitud que iban desde el 89,2 al 100%, indicando que estas secuencias probablemente correspondían a más de una especie. Al compararlas con Myc-PULPO los porcentajes de similitud oscilaron entre el 85,7 y el 99,5%, de las cuales 11 muestras mostraron valores superiores al 95%. Al comparar el mismo fragmento del gen entre Myc-PULPO con Myc-POTA la similitud fue del 99,0%. Mientras que al hacer un *Blast search* de las secuencias más cercanas a esos fragmentos fue del 90%.

A modo de curiosidad fue comparada la secuencia del gen ARNr 16S entre Myc-POTA, Myc-PULPO y “*Candidatus Mycoplasma corallicola*” (GenBank: AM911412) (Neulinger et al., 2009), un micoplasma marino encontrado en los tentáculos del coral *Lophelia pertusa*. La similitud entre “*Candidatus Mycoplasma corallicola*” y Myc-POTA fue del 80,6%; y con Myc-PULPO, del 81,3% (**Anexo V.4.2**).

Por otro lado, también fueron estudiados algunos parámetros relacionados con el cultivo de Myc-POTA y Myc-PULPO. Ambas especies fueron aisladas utilizando el medio SP4-II al 1,5% de cloruro sódico, en condición anaeróbica y a una temperatura de incubación de 18 °C, de acuerdo a nuestra experiencia, a lo encontrado en literatura y a las recomendaciones del **Grupo de Enfermedades Infecciosas e Ictiopatología** del IUSA que posee una gran y valiosa experiencia en cultivo de bacterias marinas. Una vez

que se observó el buen crecimiento de ambas especies se hizo la caracterización de sus condiciones de cultivo cambiando la temperatura de incubación, la salinidad del medio y ambos simultáneamente. Se observó que el crecimiento de ambas especies no variaba entre aquellas cultivadas con anaerobiosis y aquellas que no, por lo tanto, comenzaron a ser cultivadas en forma aeróbica, sin poner parafina sobre el medio de cultivo. Esto se hizo con el fin de no gastar material ni tiempo, así como para manipular lo menos posible las muestras, disminuyendo así el riesgo de contaminación. Se comprobó, además, que ambas especies pueden crecer a temperaturas de incubación de 4 y 25 °C, correspondiendo el menor crecimiento con la temperatura más baja, y mostrando uno más rápido a 25 °C. El cultivo no creció a 30 °C. Esto puede ser explicado considerando el hábitat de sus hospedadores, que viven en aguas cuya temperatura nunca aumenta de 25 °C (Fernández-Gil et al., 2006), manteniéndose, inclusive, a temperaturas muy bajas, como es el caso de pota que puede encontrarse a 400 y 800 m de profundidad (Pierce et al., 2010). Otra observación interesante fue su crecimiento a diferentes salinidades y a dos temperaturas de incubación: el rango de salinidad en que crecieron ambas especies fue dependiente de la temperatura a la que se mantenían. Se notó que a 18 °C Myc-PULPO y Myc-POTA, crecían en los medios al 0,5 y 1% de cloruro sódico, respectivamente, y que ambas lo hacían muy bien hasta el 4,5% de cloruro sódico. A 25 °C, por otra parte, ambas especies crecían en los medios que contenían entre 1% y 5% de cloruro sódico. En ambas temperaturas el mejor crecimiento fue observado con la salinidad de 3%. En los medios con 0, 5,5 o 6% de cloruro sódico no hubo crecimiento a ninguna de las dos temperaturas. Llama la atención que a 18 °C el límite de crecimiento se encuentre al usar 4,5% y que a 25 °C, lo puedan hacer hasta con 5% de cloruro sódico en el medio. Asimismo se observa que Myc-POTA a 18 °C pueda crecer con sólo un 0,5% de salinidad, pero a 25 °C, su límite inferior sea de 1% de cloruro sódico. Esta relación entre crecimiento y temperatura-salinidad ha sido observada en otras bacterias marinas. *Vibrio marinus*, por ejemplo, tenía valores máximos de crecimiento dependiendo de la temperatura y salinidad con que se cultivaba: a valores menores de salinidad y temperatura (7‰ a 10 °C) alcanzaba su menor valor, pero si se aumentaban ambos factores, el crecimiento observado era mucho mayor (35‰ a 20 °C). Si se

mantenía una sola salinidad y se variaba la temperatura el efecto era igual, a menor temperatura el crecimiento era menor y mayor a más temperatura, siempre que se encontrara dentro del rango de salinidad y temperatura soportado por el organismo (Stanley y Morita, 1968). En la misma especie se observó que la síntesis de proteína era inhibida a 22 °C y 25 ‰, pero si se aumentaba la temperatura a 24 °C, tendría que aumentarse la salinidad a 35‰ para obtener la misma inhibición, verificándose así la importancia de la relación temperatura-salinidad en los procesos metabólicos de esta bacteria (Cooper y Morita, 1972). La explicación facilitada por los autores para este fenómeno está relacionada con que muchos de los procesos fisiológicos de las bacterias marinas son dependientes de Na⁺ además de existir sistemas regulatorios termosensibles que permitirían a la bacteria sobrevivir a los cambios de salinidad y/o temperatura que generalmente van asociados. El caso más claro de esto ocurre en las bacterias que habitan estuarios o manglares, las cuales por las variaciones de temperatura y salinidad del medio deben tener una maquinaria metabólica de control de osmosis, permeabilidad de la membrana y maquinaria enzimática que pueda actuar cuando cambian esas condiciones. Por ejemplo, una bacteria que habita un manglar debe soportar altas temperaturas y aumento de la salinidad debido a la retirada del agua en los ciclos de baja marea, y al mismo tiempo, crecer adecuadamente en los ciclos de marea alta en que la temperatura y salinidad disminuyen por causa de la inundación de agua. Una adaptación similar podría estar presente en los micoplasmas de cefalópodos, cuyos hospedadores pueden migrar entre masas de agua de diferentes temperatura y salinidad, ya sea verticalmente en migraciones nocturnas como la pota, o viviendo cerca de la costa o en el área intermareal, como el caso del pulpo. Sería interesante ahondar en este tema y conocer cuál es el mecanismo que utilizan estos micoplasmas para compensar tales cambios, sobretodo de salinidad, pensando que carecen de pared celular por lo que seguramente tienen estrategias particulares para ello. Debido a que a 18 °C y 25 °C el crecimiento más rápido fue observado en los medios que contenían 3% ó 3,5% de cloruro sódico, se optó por continuar el cultivo con SP4-II al 3% de cloruro sódico a una temperatura de 25 °C.

El resultado de las pruebas bioquímicas empleadas para caracterizar ambas especies fue muy similar. Todas las muestras de ambas especies fueron positivas a la hidrólisis de glucosa y manosa, y negativas a la hidrólisis de urea y la reducción de tetrazolium, además de no presentar el efecto de películas y cristales en cultivos en placas de medio sólido. La única diferencia observada fue que Myc-PULPO no reduce la arginina, en cuanto que Myc-POTA sí lo hace. Además, entre las tres muestras de esta última hubo una (5H) que difirió de las otras dos y fue negativa a la reducción de arginina, quedando con un perfil igual que Myc-PULPO. Esta prueba fue repetida tres veces y siempre fueron observados estos mismos resultados. Hay que destacar además que 5H crecía en cultivo líquido mucho más rápidamente que 6H y 7H, amarilleando el medio en 24 h, cosa que pasaba con las otras dos muestras aproximadamente a las 48 h de sembradas (una vez que los tres aislamientos se adaptaron al medio). Tal vez en el momento de clonar esta muestra fue escogida una colonia de individuos que utilizaban más eficientemente los azúcares como fuente de energía, característica que se mantuvo en los sucesivos subcultivos hasta a utilizar exclusivamente esta vía metabólica, y no utilizar el aminoácido arginina como dicha fuente.

CAPÍTULO IV: Conclusiones

1. En la presente tesis se consiguió detectar la presencia de microorganismos de la Clase *Mollicutes* en 103 (11,5%) de las 894 muestras obtenidas de animales (o grupos en el caso de las medusas) marinos. De un total de 285 animales analizados, se detectaron mollicutes en 87 (30,5%). De estos 87 positivos, se pudo identificar mollicutes en 66 de ellos, identificándose 13 especies diferentes de mollicutes. De los 76 mollicutes identificados, se pudo cultivar 68 de ellos, agrupados en 10 especies.
2. En la detección de microorganismos de la Clase *Mollicutes* destaca la aplicación a tiempo real de la PCR de Van Kuppeveld y colaboradores (1992) por su eficiencia, presentando una alta sensibilidad y una especificidad del 100%.
3. El análisis de la secuencia de la región intergénica entre los genes ARNr 16S y 23S (ISR) ha sido una herramienta práctica para la rápida identificación específica de *Mollicutes*, excepto aquellos pertenecientes al género *Acholeplasma* que presentan copias diferentes de ISR, lo que hace imposible su análisis. La ventaja de esta región es que con una única PCR se obtiene el 100% de la secuencia y existe una base de datos de ella en internet con la que comparar los resultados. En el caso de no poder utilizar la ISR, el análisis del fragmento del gen ARNr 16S amplificado por la PCR convencional de Spargser y colaboradores (2002) es muy útil. La desventaja de la PCR de estos autores es que se obtiene sólo una secuencia parcial del gen ARNr 16S, en cambio sus cebadores son muy sensibles y permiten la amplificación de productos hasta cuando la concentración de ADN de la muestra utilizada es tan baja como 1,5 µg/ µl.
4. El medio de cultivo SP4-II permite el crecimiento adecuado de mollicutes provenientes de mamíferos marinos, mientras que el mismo medio con un 3% de cloruro de sodio es adecuado para el crecimiento de mollicutes provenientes de cefalópodos y medusas. Sin embargo, este medio no fue adecuado para el crecimiento eficaz de los mollicutes detectados en peces.

5. En el 30,5% de los cetáceos estudiados fueron detectados microorganismos de la Clase *Mollicutes*, en los que fue posible identificar *Mycoplasma* sp. Phocoena C-264-GEN (97% - ISR); *Mycoplasma* sp. CSL7529-conjuntiva (99% - gen ARNr 16S); *Mycoplasma* sp. AB703210 (98% - gen ARNr 16S); *Acholeplasma axanthum* (AJ311394) (93% - gen ARNr 16S). Siendo este acholeplasma el único mollicute que se pudo cultivar.
6. Es la primera vez que se estudia la presencia de microorganismos de la Clase *Mollicutes* en los pinnípedos de la Antártica. Fueron aisladas, cultivadas e identificadas seis especies: *M. zalophidermidis* (99% - ISR), *M. sp.* CSL7529-conjuntiva (99% - ISR), *M. sp.* Mirounga ES2805-ORL (99% - ISR), *M. sp.* Mirounga ES2774-NASSP4 (91% - ISR), *M. lipofasciens* ATCC 35015 (78% - ISR) y *M. zalophi* (99% - ISR).
7. La dorada, *Sparus aurata*, es una especie hospedadora de microorganismos de la Clase *Mollicutes*, sin embargo, no fue posible identificarlos ni cultivarlos.
8. La medusa *Pelagia nocticula* es una especie hospedadora de un microorganismo de la Clase *Mollicutes*: *Spiroplasma* sp. Es la primera vez que se detecta un mollicutes en medusas.
9. El pulpo común, *Octopus vulgaris*, es el hospedador de un microorganismo de la Clase *Mollicutes*, correspondiente a una nueva especie no descrita y diferente a las ya conocidas. Fue detectado en el esófago y glándula digestiva de un ejemplar y se consiguió su aislamiento, cultivo y caracterización genética y bioquímica. Fue denominado Myc-PULPO.

10. La pota, *Todarodes sagittatus*, es hospedadora de un microorganismo de la Clase *Mollicutes*, correspondiente a una nueva especie no descrita y diferente a las ya conocidas. Fue detectado en el intestino y branquias de dos ejemplares y se consiguió su aislamiento, cultivo y caracterización genética y bioquímica. Fue denominado Myc-POTA.

11. Los requerimientos de cultivo de Myc-PULPO y Myc-POTA son similares: pueden crecer en condiciones aeróbicas o anaeróbicas y en un rango de temperaturas de 4 °C a 25 °C. Existe un efecto conjunto de temperatura y salinidad sobre su crecimiento, soportando salinidades de hasta 5% a 25 °C y de 0,5% a 18 °C. El mejor crecimiento se obtiene a 25 °C en medio de cultivo SP4-II al 3% de cloruro de sodio. Sus perfiles bioquímicos son similares, con excepción de una muestra de Myc-POTA que es la única que reduce la arginina.

12. Myc-PULPO y Myc-POTA están genéticamente relacionados, mostrando porcentajes de similitud de 98,6, 72,1, y 94,4% para el gen ARNr 16S, ISR y gen ARNr 23S, respectivamente. Myc-POTA, además, presenta el gen ARNr 5S a continuación del gen ARNr 23S, sin embargo, Myc-PULPO no. Por todo esto consideramos que Myc-POTA y Myc-PULPO, aunque están relacionadas, son dos especies diferentes y nuevas del Género *Mycoplasma*.

Capítulo IV: Conclusiones

CAPÍTULO V: Anexos

V.1.2 MOLLICUTES EN MOLUSCOS.

| HOSPEDADOR | LOCALIZACIÓN | MOLLICUTES | TIPO (CEPA, CLON) | Nº GENBANK / AÑO | REFERENCIA |
|--|--------------------|---|-------------------|--|--------------------------------|
| Cardiidae <i>Ceratoderma edule</i> | Branquias | <i>Mollicutes</i> ("tipo-mycoplasma") (microscopía electrónica) | - | - | Azevedo (1993) |
| Haliotidae <i>Haliotis discus hannai</i> | Tracto digestivo | <i>Mycoplasma sp</i> | clone A9 | AY720906/2004 | Tanaka et al.(2004) |
| | - | - | clone C30 | AY720915/2004 | - |
| | - | - | B58 | AY720915/2004 | - |
| <i>Haliotis diversicolor</i> | Intestino | <i>Mollicutes</i> | clone GB96 | GU070687/2011 | Huang et al. (2010) |
| <i>Haliotis gigantea</i> | Tracto digestivo | <i>Mycoplasma sp</i> | U1 | AB621840/2011 | Iehata et al. (NP) |
| | - | - | U9 | AB621843/2011 | - |
| | - | - | UP27 | AB621871/2011 | - |
| | - | - | UC16 | AB621878/2011 | - |
| Octopodidae <i>Octopus mimus</i> | Tracto digestivo | <i>Mycoplasma sp</i> | 14 clones | AB703180/2012 | Iehata et al. (2012) |
| | - | <i>Spiroplasma sp</i> | clone CMI85 | AB703207/2012 | - |
| Ostreidae <i>Crassostrea gigas</i> | Tracto digestivo | <i>Mollicutes</i> | clone 150C2 | JF827443/2012 | Fernández-Piquer et al. (2012) |
| | - | - | clone 154G1 | JF827477/2012 | - |
| <i>Crassostrea virginica</i> | - | <i>Mollicutes</i> ("tipo-mycoplasma") (microscopía electrónica) | - | - | Harshbarger et al. (1976) |
| | Estómago | <i>Mycoplasma sp</i> | - | Similar 93% a <i>Mycoplasma mobile</i> (gen ARNr 16S) | King et al. (2012) |
| <i>Saccostrea glomerata</i> | Glándula digestiva | <i>Mollicutes</i> | - | Similar 93% a <i>Mycoplasma hyorhinis</i> (gen ARNr 16S) | Green y Barnes (2010) |
| Pectinidae <i>Chlamys delicatula</i> | Tracto digestivo | <i>Mollicutes</i> ("tipo-mycoplasma") (microscopía electrónica) | - | - | Hine y Diggles (2002) |
| <i>Patinopecten yessoensis</i> | Músculo aductor | <i>Mollicutes</i> ("tipo-mycoplasma") (microscopía electrónica) | - | - | Bower y Meyer (1991) |
| <i>Pecten novaezelandiae</i> | Tracto digestivo | <i>Mollicutes</i> ("tipo-mycoplasma") (microscopía electrónica) | - | - | Hine y Diggles (2002) |
| Placobranchidae <i>Elysia rufescens</i> | Tracto digestivo | <i>Mycoplasma sp</i> | 11 clones | - | Davis et al.(2013) |

* Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>

NP: No publicado

- : Desconocido

V.1.3 MOLLICUTES EN CRUSTÁCEOS

| HOSPEDADOR | LOCALIZACIÓN | MOLLICUTES | TIPO (CEPA, CLON) | Nº GENBANK / AÑO | REFERENCIA |
|--|---|--|---|--|---|
| Alvinocarididae <i>/Rimicaris exoculata</i> | Tracto digestivo * * * | <i>Mollicutes</i> (<i>Entomoplasmata</i>) | clone 61 clone 42 clone 2 clone 69 | AJ515719/2003 AJ515720/2003 AJ515721/2003 AJ515722/2003 | Zbinden y Cambon-Bonavita (2003) * * * |
| Cambaridae <i>/Procambarus larkii</i> | Hemolinfa, músculos, nervios y tejido conectivo | <i>Spiroplasma eriocheiris</i> | CRAYFISH | DQ917754/2008 | Bi et al.(2008) |
| Nephropidae <i>/Nephrops norvegicus</i> | Tracto digestivo | <i>Mollicutes</i> | | Similar 88% a clone Lo_Hep1.15 (EU646198) | Meziti et al.(2012) |
| Palaemonidae <i>/Macrobrachium rosenbergii</i> | Hemolinfa, tejido conectivo(tracto digestivo, hepatopáncreas y músculo cardiaco) | <i>Spiroplasma</i> sp | macrobrachium-9 | HQ692058/2011 | Liang et al.(2011) |
| Parastacidae <i>/Cherax quadricarinatus</i> | Cutícula | <i>Mollicutes</i> ("tipo-micoplasma") (<i>microscopia electrónica</i>) | - | - | Jiménez et al.(1991) |
| Penaeidae <i>/Penaeus chinensis</i> | Hepatopáncreas | <i>Mollicutes</i> ("tipo-micoplasma") (<i>microscopia electrónica</i>) | - | - | Yang y Wu (1992) |
| <i>/Penaeus japonicus</i> | * | <i>Mollicutes</i> ("tipo-micoplasma") (<i>microscopia electrónica</i>) | - | - | Choi et al.(1991) |
| <i>/Penaeus monodon</i> | Tracto digestivo Cerebro, branquias y ojos * * Tracto digestivo | <i>Mycoplasma corogypsi</i> <i>Mycoplasma monodon</i> <i>Mycoplasma</i> sp * * | - - MP1 MP2 - | - AF042194/1998 - - - | Chaiyapechara et al.(2011) Ghadersohi y Owens (NP) Ghadersohi y Owens (1999) * Chaiyapechara et al.(2011) |
| <i>/Penaeus vannamei</i> | Hepatopáncreas Hemolinfa * Hepatopáncreas | <i>Mollicutes</i> ("tipo-micoplasma") (<i>microscopia electrónica</i>) <i>Spiroplasma eriocheiris</i> <i>Spiroplasma penaei</i> <i>Spiroplasma</i> sp (<i>microscopia electrónica</i>) | - SHRIMP SHRIMP - | - DQ917755/2008 EU544545/2010 - | Kroi et al.(1991) Bi et al.(2008) Nunan et al.(2011) Kroi et al.(1991) |
| Portunidae <i>/Scylla serrat</i> | Branquias | <i>Acholeplasma</i> sp | ZJ2005 | GU985440/2011 | Chen et al.(2011) |
| Varunidae <i>/Eriocheir sinensis</i> | Hemolinfa, ganglios pectorales y músculo cardiaco | <i>Spiroplasma eriocheiris</i> | CRAB | AY920929/2005 DQ917753/2008 | Wang et al.(2004) Bi et al.(2008) |

* Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/>

NP: No publicado

*: Desconocido

V.1.4 MOLLICUTES EN PECES

| HOSPEDADOR | LOCALIZACIÓN | MOLLICUTES | TIPO (CEPA, CLON) | Nº GENBANK / AÑO | REFERENCIA |
|--|------------------|--|-------------------|--|--|
| <i>Bagridae</i> <i>/Pelteobagrus fulvidraco</i> | Estómago | <i>Mollicutes</i> (<i>Mycoplasmataceae</i>) | SC24 | GU293190/2012 | Wu et al. (2012) |
| | Estómago | " | SC38 | GU293201/2012 | " |
| | Estómago | " | SC57 | GU293212/2012 | " |
| | Estómago | <i>Spiroplasma</i> sp | SC63 | GU293217/2012 | " |
| <i>Cyprinidae</i> <i>/Tinca tinca</i> | Branquias | <i>Mycoplasma mobile</i> | | AY737011/2006 | Kirchhoff et al. (1987) Volokhov et al. (2006) |
| <i>Gadidae</i> <i>/Gadus morhua</i> | Bazo | <i>Mollicutes</i> (<i>Mycoplasmataceae</i>) | T2110 | DQ318957/2006 | Nylund et al. (2006) |
| | Larva entera | <i>Mycoplasma</i> sp | - | Similar 95% a <i>Mycoplasma moatsii</i> (gen ARNr 16S) | McIntosh et al. (2008) |
| <i>Gobiidae</i> <i>/Gillichthys mirabilis</i> | Tracto digestivo | <i>Mycoplasma</i> sp | clone TP-2 | DQ340193/ 2007 | Bano et al. (2007) |
| | Tracto digestivo | " | clone C9 | DQ340194/ 2007 | " |
| | " | " | clone SM-1 | DQ340195/ 2007 | " |
| | " | " | clone C10 | DQ340196/ 2007 | " |
| | " | " | clone WC-1 | DQ340197/ 2007 | " |
| | " | " | clone C11 | DQ340198/ 2007 | " |
| " | " | " | clone C12 | DQ340199/ 2007 | " |
| <i>Kyphosidae</i> <i>/Kyphosus sydneyanus</i> | Tracto digestivo | <i>Mollicutes</i> (<i>Acholeplasma?</i>) | - | AY590187/2004 | Moran et al. (2005) |
| <i>Nototheniidae</i> <i>/Notothenia coriiceps</i> | Tracto digestivo | <i>Mycoplasma</i> sp | - | Similar 95% a <i>Mycoplasma moatsii</i> (gen ARNr 16S) | Ward et al. (2009) |
| <i>Petromyzontidae</i> <i>/Petromyzon marinus</i> | Tracto digestivo | <i>Mycoplasma</i> sp | 8 clones | JX453991/2012 | Tetlock et al. (2012) |
| | " | <i>Ureaplasma</i> sp | 36 clones | JX453994/2012 | " |
| <i>Pleuronectidae</i> <i>/Kareius bicoloratus</i> | Intestino | <i>Mycoplasma</i> sp | clone K.b-1 | HM031446/2011 | Wang (2011) |
| <i>/Microstomus kitt</i> | Branquias | <i>Mycoplasma</i> sp | - | - | Windsor et al. (2010) |
| <i>Salmonidae</i> <i>/Brachymystax lenok</i> | Intestino | <i>Mycoplasma</i> sp | - | - | Sukhanova et al. (2014) |
| <i>/Coregonus lavaretus pidschian</i> | Intestino | <i>Mycoplasma</i> sp | - | - | Sukhanova et al. (2014) |
| <i>/Coregonus migratorius</i> | Intestino | <i>Mycoplasma</i> sp | clone M3-6 | FR799680/2014 | Sukhanova et al. (2014) |
| <i>/Coregonus hybridus (Coregonus migratorius x Coregonus lavaretus pidschian)</i> | Intestino | <i>Mycoplasma</i> sp | clone M7-6 | FR799684/2014 | Sukhanova et al. (2014) |
| <i>/Oncorhynchus mykiss</i> | Intestino | <i>Mycoplasma</i> sp | - | Similar 95,3% a DQ340193 (gen ARNr 16S) | Kim et al. (2007) |
| <i>/Prosopium cilindraceum</i> | Intestino | <i>Mycoplasma</i> sp. | - | - | Sukhanova et al. (2014) |
| <i>/Salmo salar</i> | Intestino | <i>Mycoplasma</i> sp. | BHJA | AY065998/ 2003 | Holben et al. (2002) |
| | " | " | clone 3 | FJ560444/ 2009 | Dione et al. (2009) |
| | " | " | clone A | KC169759/ 2013 | Green et al. (2013) |
| | " | " | clone X4-5 | FR799681/2011 | Sukhanova et al. (2011) |
| | " | " | clone X7-1 | FR799682/2011 | " |
| | " | " | clone XA-9 | FR799683/2011 | " |
| | " | " | 11 clones | FR799624-FR799634/ 2014 | Sukhanova et al. (2014) |
| | " | " | 17 clones | FR99635-FR799651/ 2014 | " |
| <i>/Thymallus baicalensis</i> | " | " | 2 clones | FR799652-FR799653/ 2014 | " |
| | " | " | 9 clones | FR799670-FR799678/ 2014 | " |
| | Intestino | <i>Mycoplasma</i> sp | clone F48-06 | FM897201/2008 | Sukhanova et al. (2011) |
| | " | " | clone F62-07 | FM897202/2008 | " |
| " | " | clone F66-04 | FM897203/2008 | " | |
| " | " | - | - | " | |
| <i>/Thymallus sp</i> | Intestino | <i>Mycoplasma</i> sp | clone LX3-1 | FR799679/2011 | Sukhanova et al. (2014) Sukhanova et al. (2011) |
| " | " | " | 16 clones | FR799654-FR799669/ 2014 | Sukhanova et al. (2014) |

| | | | | | |
|-------------------------------|-----------|-----------------------|--------------|--|-------------------------------|
| Scianidae | | | | | |
| / <i>Pseudosciaena crocea</i> | Intestino | <i>Mycoplasma sp</i> | 5(9-1)(5.21) | HM489893/2010 | Zhang y Feng (NP) |
| | " | <i>Ureaplasma sp</i> | 1.8-1 | HM446526/2010 | " |
| / <i>Sciaenops ocellatus</i> | Intestino | <i>Spiroplasma sp</i> | clone S.o-1 | HM031425/2011 | Wang (2011) |
| Scobridae | | | | | |
| / <i>Scomber scombrus</i> | Intestino | <i>Mycoplasma sp</i> | - | Similar 97% a <i>Mycoplasma iguanae</i> (gen ARNr 16S) | Svanevik y Lunestad (2011) |
| Tetraodontidae | | | | | |
| / <i>Takifugu obscurus</i> | Intestino | <i>Mycoplasma sp</i> | - | AB649427/2011 | Lin et al. (NP) |

* Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>

NP: No publicado

- : Desconocido

V.1.5 MOLLICUTES EN PINNÍPEDOS Y SIRÉNIDOS

| HOSPEDADOR | LOCALIZACIÓN | MOLLICUTES | TIPO (CEPA, CLON) | Nº GENBANK / AÑO | REFERENCIA |
|--|---|---|---------------------|--|------------------------|
| PINNÍPEDOS | | | | | |
| <i>Otaridae</i> <i>Arctocephalus pusillus doriferus</i> | Fosas nasales, pulmones (feto) | <i>Mycoplasma phocae</i> | - | - | Lynch et al. (2011) |
| | Nódulos linfáticos, pulmones | <i>Mycoplasma phocicerebrale</i> | - | - | " |
| | Fosas nasales, nódulos linfáticos, pulmones | <i>Mycoplasma sp</i> | CSL7503-lung | EU714238/ 2008 | " |
| | Pulmones (feto) | " | - | Similar 98% a <i>Mycoplasma sp</i> (EU859984/ 2008) (gen ARNr 16S) | " |
| | Pulmones (feto) | " | - | Similar 94% a <i>Mycoplasma sp</i> (FJ876266/ 2009) (gen ARNr 16S) | " |
| | Fosas nasales, nódulos linfáticos | <i>Mycoplasma zalophi</i> | - | - | " |
| <i>Zalophus californianus</i> | Sangre | Candidatus <i>Mycoplasma haemozalophi</i> | C606 | GU904997/2011 | Volokhov et al. (2011) |
| | " | " | CSL 7822 | GU904999/2011 | " |
| | " | " | CSL 7758 | GU905000/2011 | " |
| | " | " | CSL 7801 | GU905001/2011 | " |
| | " | " | C795 | GU905002/2011 | " |
| | " | " | CSL 7897 | GU905003/2011 | " |
| | " | " | CSL 7783 | GU905004/2011 | " |
| | " | " | CSL 7755 | GU905005/2011 | " |
| | " | " | CSL 7860 | GU905006/2011 | " |
| | " | " | CSL 7881 | GU905007/2011 | " |
| | " | " | CSL 7666 | GU905008/2011 | " |
| | " | " | CSL 7873 | GU905009/2011 | " |
| | " | " | CSL 7871 | GU905010/2011 | " |
| | " | " | C739 | GU905011/2011 | " |
| | " | " | C796 | GU905012/2011 | " |
| | Muestra nasofaríngea | <i>Mycoplasma phocidae</i> | CSL 7498 | EU827597/2008 | Volokhov (NP) |
| | Pulmones | <i>Mycoplasma phocirhinis</i> | CSL7520-lung | EU859982/2008 | " |
| | Conjuntiva | " | CSL 7475-4 | EU827598/2008 | " |
| | Pulmones | <i>Mycoplasma sp.</i> | CSL7503-lung | EU714238/ 2008 | Volokhov (NP) |
| | Pulmones | " | CSL7491-lung | EU859981/ 2008 | " |
| | Conjuntiva | " | CSL7529-conjunctiva | EU859984/ 2008 | " |
| | Oral | " | CSL7489-oral | EU859985/ 2008 | " |
| | - | <i>Mycoplasma zalophi</i> | <i>M.zalophi</i> | AF493543/ 2004 | Brown et al. (NP) |
| | - | " | CSL 4296 | DQ530426/ 2006 | Volokhov (NP) |
| | - | " | CSL 5346 | DQ530427/ 2006 | " |
| | - | " | CSL 5195 | DQ840494/ 2006 | " |
| | Muestra nasofaríngea | " | CSL 7476 | EU719606/ 2008 | " |
| | " | " | " | " | " |
| | Oral | " | CSL 7485 | EU859970/ 2008 | " |
| | Oral | " | CSL 7492 | EU908860/ 2008 | " |
| | - | " | CSL 7520 | FJ226581/ 2009 | " |
| | - | " | CSL 7640 | FJ876268/ 2009 | " |
| | - | <i>Mycoplasma zalophidermidis</i> | CSL 4779 | DQ840512/ 2008 | " |
| | Pulmones | <i>Mycoplasma zalophidermidis</i> | CSL7518-lung | EU714239/ 2008 | " |
| | Genital | <i>Ureaplasma sp</i> | CSL7590-GEN | HQ438042/ 2010 | Volokhov (NP) |
| | " | " | CSL7644-GEN | HQ377518/ 2010 | " |
| | " | " | CSL7743-GEN | HQ377519/ 2010 | " |

| | | | | | |
|---------------------------------|---|---------------------------------------|------------------|---------------------------------|---|
| Phocidae | | | | | |
| <i>/Mirounga angustirostris</i> | Genital | <i>Mycoplasma</i> sp. <i>Mirounga</i> | ES2806-GEN | GU905023 / 2010 | Volokhov y Gulland (NP) |
| | Muestra nasofaríngea | " | ES2806-NAS | GU905024 / 2010 | " |
| | Muestra nasofaríngea | " | ES2774-NAS | GU905026 / 2010 | " |
| | Muestra nasofaríngea | " | ES2774-NASSP4 | GU905029 / 2010 | " |
| | - | " | ES2805-ORL | GU905031 / 2010 | " |
| | - | " | ES2783_AG_GEN | JN644768 / 2012 | Volokhov et al. (2012) |
| | - | " | ES2714_AG_GEN | JN644767 / 2013 | " |
| | Vagina | <i>Ureaplasma</i> sp. | ES2783-GEN | JF731007 / 2011 | Volokhov y Gulland (NP) |
| <i>/Phoca vitulina</i> | Tracto respiratorio | <i>Mycoplasma phocae</i> | | AF304325/2011 | Königsson et al. (2001) |
| | - | <i>Mycoplasma phocidae</i> | CSL 5364 | DQ521597/2006 | Volokhov (NP) |
| | - | " | CSL 5410 | DQ521596/2006 | " |
| | - | " | CSL 5263 | DQ521595/2006 | " |
| | - | " | CSL 4693 | DQ521594/2006 | " |
| | - | " | CSL 4949 | DQ523534/2006 | " |
| | - | " | CSL 4957 | DQ523533/2006 | " |
| | - | " | CSL 4945 | DQ523532/2006 | " |
| | - | " | CSL 4956 | DQ523531/2006 | " |
| | - | " | CSL 4801 | DQ523530/2006 | " |
| | - | " | CSL 4998 | DQ523529/2006 | " |
| | - | " | CSL 5259 | DQ523528/2006 | " |
| | Tracto respiratorio | " | 105 | JN935863/2012 | Königsson et al. (2001) |
| | Muestra nasofaríngea | " | C264-NAS | GU905028/2010 | Volokhov y Gulland (NP) |
| | Cerebro, Fosas | <i>Mycoplasma phocicerebrale</i> | 1049 | NR_025133/2009 | Giebel et al. (1991) |
| | nasales, garganta, pulmones, corazón | " | CSL 5195S2 | DQ840513/2006 | Königsson et al. (2001) |
| | Pulmones (pus) | " | ATCC 51405 | JN935879/2012 | Volokhov (NP) |
| | - | " | Cheryl | JN935876/2012 | Volokhov et al. (2012) |
| | Fosas nasales, garganta, tráquea, pulmones, corazón | <i>Mycoplasma phocirhinis</i> | 852 / ATCC 49639 | NR_025134/2009 AY973567/2006 | Giebel et al. (1991) Königsson et al. (2001) |
| SIRÉNIDOS | | | | | |
| Trechidae | | | | | |
| <i>/Trichechus manatus</i> | - | <i>Acholeplasma</i> sp. DM-2009 | Ariel | FJ590759/2009 | Volokhov y Davidson (NP) |
| <i>latirostris</i> | - | " | Holly | FJ590760/2009 | " |
| | - | " | Oakley | FJ590761/2009 | " |
| | - | " | Lorelei | FJ590762/2009 | " |

* Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/>

NP: No publicado

- : Desconocido

V.1.6 MOLLICUTES EN CETÁCEOS

| HOSPEDADOR | LOCALIZACIÓN | MOLLICUTES | TIPO (CEPA, CLON) | Nº GENBANK ¹ / AÑO | REFERENCIA |
|---|------------------|---|-------------------|---|--|
| Delphinidae <i>/Steno bredanensis</i> | Abertura genital | <i>Mycoplasma opalescens</i> ^a | - | - | Poveda et al. (2009) |
| | Útero | <i>Mycoplasma phocirhinis</i> | - | - | * |
| Phocoenidae <i>/Neophocaena phocaenoides asiaorientalis</i> | Heces | <i>Mycoplasma</i> sp. | PLYFP48 | JN792314/2012 | McLaughlin et al. (2012) |
| | Heces | " | PLYFP49 | JN792315/2012 | " |
| | Heces | <i>Ureaplasma</i> sp | 47 Clones | JN792313-JN792267/2012 | " |
| <i>/Phocoena phocoena</i> | Pulmones | <i>Mycoplasma phocicebrale</i> | ATCC 51405 | JN935879/2012 | Foster et al. (2011) |
| | Pulmones | <i>Mycoplasma</i> sp | M1/05 | FJ233097/ 2009 | McLaughlin et al. (NP) Foster et al. (2011) |
| | Bazo, pulmones | " | M49/06 | FJ233098/ 2009 | " |
| | Pulmones | " | M74/06/1 | FJ233099/ 2009 | " |
| | Pulmones | " | M69/07/1 | FJ233100/ 2009 | " |
| | Riñón, pulmones | " | M866/96 | | Foster et al. (2011) |
| | Vagina | <i>Mycoplasma</i> sp. <i>Phocoena</i> | C-269 | FJ876266/ 2009 | Volokhov y Gulland (NP) |
| | - | " | C-264-GEN | GU905021/ 2010 | " |
| Ziphiidae <i>/Mesoplodon bidens</i> | Riñón | <i>Mycoplasma</i> sp | M35/08 | Relacionado con <i>Mycoplasma</i> sp 13CL | Foster et al. (2011) |

* Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>

NP: No publicado

- : Desconocido

^a: Probable contaminación al momento del muestreo

V.2 PROTOCOLOS Y MATERIALES

V.2.1 PROTOCOLO: TOMA DE MUESTRAS EN CETÁCEOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MOLLICUTES

1. Desenvolver un extremo de la platina del hisopo.
2. Arrastrar o introducir el hisopo por el área de muestreo, siendo prioritarias:

En caso de NO ABRIR el animal:

- **EL ÁREA GENITAL:** INTRODUCIR EL HISOPO EN EL ORIFICIO UROGENITAL.
- **ANO:** INTRODUCIR EL HISOPO EN EL ANO
- **ESPIRÁCULO:** INTRODUCIR EL HISOPO EN EL ESPIRÁCULO

En caso de ABRIR el animal:

- **EL ÁREA GENITAL:** PASAR EL HISOPO POR LAS PAREDES DEL ÚTERO O TESTÍCULOS.
- **PULMONES:** PASAR EL HISOPO POR DENTRO DE LOS PULMONES
- **EN CASO DE MAMITIS:** PASAR EL HISOPO POR DENTRO DE LAS MAMAS
- **EN CASO DE ARTRITIS:** PASAR EL HISOPO POR EL LÍQUIDO ARTICULAR

3. Introducir el hisopo en el tubo de medio de cultivo.
4. Cortar el hisopo por la mitad (tijeras).
5. Tapar el tubo de muestreo dejando la mitad del hisopo con la muestra dentro.
6. Marcar cada tubo indicando:
 - **CÓDIGO DE IDENTIFICACIÓN**
 - **TIPO DE MUESTRA**
7. Los tubos son mantenidos a temperatura ambiente hasta el momento de poder ser puestos a 37°C.

V.2.2 MEDIOS DE CULTIVO

V.2.2.1 Medio de colecta y transporte

RPMI-1640 Medium (R8758, Sigma) suplementado con suero de caballo al 10% v/v.

V.2.2.2 Medios de aislamiento:

V.2.2.2.1 FRIIS (Ross y Whittlestone, 1983)

| FRIIS | |
|---|----------|
| Fase A | |
| Bacto PPLO broth | 5 g |
| Brain Heart Infusion (BHI) | 4,8 g |
| Solución balanceada de Hanks A (1) | 25 ml |
| Solución balanceada de Hanks B (2) | 25 ml |
| Agua bidestilada | 500 ml |
| Se ajusta el pH a 7,4 y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 30 min (Para el medio sólido se incluyen en esta fase 16 ml de solución de Dextran al 1% y 11,4 g de Agar Bacteriológico) | |
| Fase B | |
| Extracto fresco de levadura (25% p/v) (3) | 38 ml |
| Solución de ampicilina (100 mg/ml) | 5 ml |
| Solución de extracto de levadura (5 g/ 250 ml) | 120 ml |
| Solución de rojo fenol (0,2%) | 7,5 ml |
| Agua bidestilada | 229,5 ml |
| Se ajusta a pH: 7,4. Se prefiltra a través de papel de filtro y se filtra por una membrana Millipore de 0,22 µm. | |
| Fase C | |
| Suero de caballo estéril inactivado (4) | 85 ml |
| Suero porcino estéril inactivado (4) | 85 ml |
| Asépticamente se agrega a la fase A, las fases B y C. El medio líquido se distribuye en tubos estériles de 5 ml, a razón de 2 ml/tubo y se guardan a -20 °C hasta su uso. En el caso del medio sólido, antes de mezclar las tres fases, se atemperan a 45 °C, para distribuirse inmediatamente después de mezclarse en placas de Petri estériles de 15 mm de diámetro, las cuales se conservan a 4 °C | |

V.2.2.2.2 **PH (Kirchhoff y Rosengarten, 1984)**

PH

Fase A

| | |
|------------------|--------|
| Bacto PPLO broth | 16,8 g |
| Agua destilada | 700 ml |

Se ajusta el pH a 7,4 y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 30 min

Para el medio sólido se incluyen en esta fase 28 g de Bacto PPLO agarosa en vez de Bacto PPLO Broth

Fase B

| | |
|---|--------|
| Extracto fresco de levadura (25% p/v) (3) | 18 ml |
| Solución de penicilina (100.000 UI/ml) | 6 ml |
| Solución de DNA (0,4% p/v) | 4,4 ml |
| B-NAD | 0,1 g |
| L-cisteína hidrocloreídrica | 0,1 g |
| Agua bidestilada | 91 ml |

Se ajusta a pH: 7,4. Se filtra por una membrana Millipore de 0,22 µm.

Fase C

| | |
|---|--------|
| Suero de caballo estéril inactivado (4) | 178 ml |
|---|--------|

Asépticamente se agrega a la fase A, las fases B y C. El medio líquido se distribuye en tubos estériles de 5 ml, a razón de 2 ml/tubo y se guardan a -20 °C hasta su uso. En el caso del medio sólido, antes de mezclar las tres fases, se atemperan a 45 °C, para distribuirse inmediatamente después de mezclarse en placas de Petri estériles de 15 mm de diámetro, las cuales se conservan a 4 °C

V.2.2.2.3 SP4-II (Ramírez et al., 1997).

Adicionalmente, fue utilizado SP4-II con sal (desde 0,5 a 6%) para el aislamiento y pruebas anexas con los mollicutes provenientes de invertebrados acuáticos.

SP4-II

| Fase A | |
|------------------|--------|
| Bacto PPLO broth | 4,2 g |
| Bacto peptona | 6,4 g |
| Bacto tryptona | 12 g |
| Agua destilada | 535 ml |

(Para los medios con salinidad se les incluye la sal en esta fase)

Se ajusta el pH a 7,8 y se esteriliza en autoclave a 121°C durante 30 min

(Para el medio sólido se incluyen en esta fase 7.0 g de Agar Bacteriológico)

| Fase B | |
|--|----------|
| Extracto fresco de levadura (25% p/v) (3) | 42 ml |
| Solución de ampicilina (100 mg/ml) | 2,5 ml |
| Solución de extracto de levadura (5 g/ 250 ml) | 120 ml |
| Solución de DNA (0,4% p/v) | 5,5 ml |
| Piruvato sódico | 2,5 ml |
| B-NAD | 0,125 g |
| L-cisteína hidroclorehidrica | 0,125 g |
| CMRL 1066 (10X) | 60 ml |
| Solución de rojo fenol (0,1%) | 24 ml |
| Agua bidestilada | 207,5 ml |

Se ajusta a pH: 7,2. Se prefiltra a través de papel de filtro y se filtra por una membrana Millipore de 0,22 µm.

| Fase C | |
|---|--------|
| Suero de caballo estéril inactivado (4) | 251 ml |

Asépticamente se agrega a la fase A, las fases B y C. El medio líquido se distribuye en tubos estériles de 5 ml, a razón de 2 ml/tubo y se guardan a -20 °C hasta su uso. En el caso del medio sólido, antes de mezclar las tres fases, se atemperan a 45 °C, para distribuirse inmediatamente después de mezclarse en placas de Petri estériles de 15 mm de diámetro, las cuales se conservan a 4 °C

1. *Solución balanceada de Hanks A*

| | |
|--|--------|
| Cloruro Sódico (NaCl) | 80 g |
| Cloruro Potásico (KCl) | 4 g |
| Sulfato de magnesio heptahidrato (MgSO ₄ ·7H ₂ O) | 1 g |
| Cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl ₂ ·6H ₂ O) | 1 g |
| Cloruro Cálcico (CaCl ₂) | 1,4 g |
| Agua destilada | 500 ml |

2. *Solución balanceada de Hanks B*

| | |
|---|--------|
| di-sodio hidrógeno fosfato dodecahidrato (Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O) | 80 g |
| Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄) | 4 g |
| Agua destilada | 500 ml |

3. *Preparación del extracto de levadura (Saccharomyces cerevisiae) al 25% p/v:*
En un baño atemperado a 45 °C se calientan 500 ml de agua bidestilada. Se añaden 500 g de levadura de panadería fresca en pequeños fragmentos y se aumenta la temperatura del baño a 80 °C durante 90 min. Se retira la solución del baño y se deposita en agua fría durante aproximadamente 15 min. Transcurrido este tiempo y con ácido clorhídrico concentrado se ajusta el pH a 4,5. Se mantiene la suspensión a la misma temperatura durante más 30 min. Se centrifuga dicha suspensión a 3.000 x g durante 30 min, se recoge el sobrenadante y se añade el mismo volumen de agua bidestilada. Por último, se filtra por filtros estériles de diámetro de poro de 0,22 µm. El extracto de levadura puede conservarse 6 meses en congelación a -20°C.
4. *La inactivación del suero (de caballo o porcino) se realiza calentándolo (descongelado) en baño María a 56 °C durante 30 min. Posteriormente tal suero descomplementado es mantenido a -20 °C.*

V.2.2.3 Medios para la caracterización bioquímica de mollicutes (Poveda, 1998)

Todos los componentes de los medios para determinar la bioquímica de mollicutes son esterilizados antes de mezclarse, y conservados a -20°C. La solución de HIB (*Heart infusion broth*) y la de HIA (*Heart infusion agar*) se esterilizan en autoclave y el resto por filtración (0,20 µm), a excepción del suero de caballo que se comercializa ya estéril. Una vez realizada la mezcla, se ajusta al pH adecuado y se esteriliza por filtración (0,20 µm). Los medios líquidos son distribuidos en tubos de plástico estériles a razón de 2 ml por tubo y se congelan hasta su uso.

| Medio líquido estándar (20% de suero) | |
|--|--------|
| Solución de HIB (2,5% p/v) | 296 ml |
| Solución de ADN (0,2% p/v) | 4 ml |
| Suero de caballo inactivado | 80 ml |
| Solución de extracto de levadura (10% p/v) | 20 ml |
| pH: 7,6 | |

| Medio líquido estándar (10% de suero) | |
|--|--------|
| Solución de HIB (2,5% p/v) | 336 ml |
| Solución de ADN (0,2% p/v) | 4 ml |
| Suero de caballo inactivado | 40 ml |
| Solución de extracto de levadura (10% p/v) | 20 ml |
| pH: 7,6 | |

| Medio para la prueba de la fermentación de glucosa | |
|---|--------|
| Solución de HIB (2,5% p/v) | 146 ml |
| Solución de ADN (0,2% p/v) | 2 ml |
| Suero de caballo inactivado | 20 ml |
| Solución de extracto de levadura (10% p/v) | 10 ml |
| Solución de glucosa (10% p/v) | 20 ml |
| Solución de rojo fenol (0,5%p/v) | 2 ml |
| pH: 7,6 | |

| Medio para la prueba de la fermentación de manosa | |
|--|--------|
| Solución de HIB (2,5% p/v) | 146 ml |
| Solución de ADN (0,2% p/v) | 2 ml |
| Suero de caballo inactivado | 20 ml |
| Solución de extracto de levadura (10% p/v) | 10 ml |
| Solución de manosa (10% p/v) | 20 ml |
| Solución de rojo fenol (0,5% p/v) | 2 ml |
| pH: 7,6 | |

| Medio para la prueba de la hidrólisis de urea | |
|--|--------|
| Solución de HIB (2,5% p/v) | 146 ml |
| Solución de ADN (0,2% p/v) | 2 ml |
| Suero de caballo inactivado | 20 ml |
| Solución de extracto de levadura (10% p/v) | 10 ml |
| Solución de urea (10% p/v) | 20 ml |
| Solución de rojo fenol (0,5% p/v) | 2 ml |
| pH: 7,6 | |

| Medio para la prueba de la hidrólisis de arginina | |
|--|--------|
| Solución de HIB (2,5% p/v) | 146 ml |
| Solución de ADN (0,2% p/v) | 2 ml |
| Suero de caballo inactivado | 20 ml |
| Solución de extracto de levadura (10% p/v) | 10 ml |
| Solución de arginina (10% p/v) | 20 ml |
| Solución de rojo fenol (0,5% p/v) | 2 ml |
| pH: 7,6 | |

| Medio para la prueba del tetrazolium | |
|--|--------|
| Solución de HIB (2,5% p/v) | 146 ml |
| Solución de ADN (0,2% p/v) | 2 ml |
| Suero de caballo inactivado | 40 ml |
| Solución de extracto de levadura (10% p/v) | 10 ml |
| Solución de 2,3,5-trifeniltetrazolium (2% p/v) | 20 ml |
| pH: 7,6 | |

V.2.3 REACTIVOS Y SOLUCIONES

V.2.3.1 *Solución protectora para liofilización*

Para la preparación de la solución protectora de liofilización se disuelven 6,67 g de myo-Inositol en 33,3 ml de agua destilada. Se filtra por una membrana “Millipore” de 0,22 µm y se añade 100 ml de suero de caballo inactivado.

V.2.3.2 *Reactivos de la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE)*

a) Solución de acrilamida al 60% de urea: “High” (H):

- Se mezclan 126 g de urea con agua estéril hasta obtener una solución con un volumen de 200 ml.
- Se añaden 125 ml de acrilamida (30% v/v) a la solución anterior más 120 ml de formamida desionizada y 10 ml de buffer 50X TAE [Tris acetato 2 M + Na₂EDTA 100mM].
- Se rellena una cubeta con agua estéril hasta alcanzar un volumen de 500 ml.
- Se mezclan suavemente ambas soluciones.

b) Solución de acrilamida al 30% de urea: “Low” (L):

- Se mezclan 63,1 g de urea con agua estéril hasta obtener una solución con un volumen de 200 ml.
- Se añadieron 125 ml de acrilamida (30% v/v) a la solución anterior más 60 ml de formamida desionizada y 10 ml de buffer 50 x TAE.
- Se rellena una cubeta con agua estéril hasta alcanzar un volumen de 500 ml.
- Se mezclan suavemente ambas soluciones.

V.2.4 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN

Para la extracción y purificación de ADN fueron utilizados dos kits comerciales de la casa OMEGA bio-tek (www.omegabiotek.com)

| | | |
|--------------------------------|--------------------------------------|----------|
| a) Extracción de ADN: | E.Z.N.A. [®] Tissue DNA kit | D3396-02 |
| b) Purificación de ADN: | Cycle Pure Kit | D6492-02 |

V.3 PCR's

V.3.1 PCR'S ESPECÍFICAS PARA LA DETECCIÓN DE MOLLICUTES.

V.3.1.1 Hotzel y colaboradores (2003). Fragmento del gen ARNr 23S.

Cebadores: Myc23F172 (5'-CTA AGG TDA GCG AGW DAA CTA TA-3')
Myc23R184 (5'-CCC CYC WTS YTT YAC TGM GGC-3')

Amplicón: 102-110 pb

Protocolo:

| Ciclo | Temperatura (°C) | Tiempo |
|-----------|------------------|--------|
| I | 94 | 1' |
| | 94 | 15" |
| II (x 35) | 48 | 30" |
| | 72 | 30" |
| III | 72 | 1' |

Hold: 16 °C

V.3.1.2 Spargser y colaboradores (2002). Fragmento del gen ARNr 16S.

Cebadores: MW28 (5'- CCA GAC TCC TAC GGG AGG CA-3')
MW29 (5'- TGC GAG CAT ACT ACT CAG GC-3')

Amplicón: 580 pb

Protocolo:

| Ciclo | Temperatura (°C) | Tiempo |
|-----------|------------------|--------|
| I | 94 | 1' |
| | 94 | 80" |
| II (x 35) | 55 | 80" |
| | 72 | 2,5' |
| III | 72 | 5' |

Hold: 16 °C

V.3.1.3 Mc Auliffe y colaboradores (2005). Fragmento del gen ARNr 16S.

Cebadores: GC341F (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG
GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3')

R543 (5'-ACC TAT GTA TTA CCG CG-3')

Amplicón: 340 pb

Protocolo:

| Ciclo | Temperatura (°C) | Tiempo |
|-----------|------------------|--------|
| I | 94 | 5' |
| | 95 | 1' |
| II (x 29) | 56 | 45" |
| | 72 | 1' |
| III | 72 | 10' |

Hold: 16 °C

V.3.1.4 Van Kuppeveld y colaboradores (1992). Fragmento del gen ARNr 16S.

Cebadores: MGSO (5'-TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC-3')

GPO3 (5'-G GGA GCA AAC AGG ATT AGA TAC CCT-3')

Amplicón: 270 pb

Protocolo:

| Ciclo | Temperatura (°C) | Tiempo |
|-----------|------------------|--------|
| I | 94 | 2' |
| | 94 | 30" |
| II (x 40) | 60 | 30" |
| | 72 | 30" |
| III | 72 | 30" |

Hold: 16 °C

V.3.1.5 Botes y colaboradores (2005). Fragmento del gen ARNr 16S.

Cebadores: MGSO (5'-TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC-3')
 GPO3F (5'-TGG GGA GCA AAC AGG ATT AGA TAC C-3')

Amplificación: 270 pb

Protocolo:

| Ciclo | Temperatura (°C) | Tiempo |
|-----------|------------------|--------|
| I | 94 | 2' |
| | 94 | 30" |
| II (x 40) | 60 | 30" |
| | 72 | 30" |
| III | 72 | 30" |

Hold: 16 °C

V.3.2 GENES RIBOSÓMICOS Y REGIONES INTERGÉNICAS.

V.3.2.1 Yavari (2010). Gen ARNr 16S.

| Fragmento | Cebadores |
|--------------------|---|
| <i>Fragmento A</i> | 16S – Start pos (5'-GAG AGT TTG ATC CTG CGT CAG G-3') 16S – 550 neg (5'-CCC AAT AAA TCC GGA TAA CGC TTG C-3') |
| <i>Fragmento B</i> | 16S – 510 pos (5'-CTG ACG CGT AAC TAT GTC CCA GCA G-3') 16S – 1050 neg (5'-GCT GAC GAC AAC CAT GCA GC-3') |
| <i>Fragmento C</i> | 16S – 980 pos (5'-CGA AGA ACC TTA CCC ACT CTT GAC ATC-3') 16S – end neg (5'-GGT AAT CCA TCC CCA CGT TCT CG-3') |

Amplificación: ≈ 1500 pb

Protocolo:

| Ciclo | Temperatura (°C) | Tiempo |
|-----------|------------------|--------|
| I | 94 | 2' |
| | 94 | 15" |
| II (x 35) | 60 | 30" |
| | 72 | 30" |
| III | 72 | 30" |

Hold: 16 °C

V.3.2.2 Poveda (2012). Gen ARNr 23S.

| Fragmento | Cebadores |
|--------------------|---|
| <i>Fragmento A</i> | 23S – 1F (5'- GTT CTT TGA AAA CTG AAT ATT A -3') 23S – 1R (5'-CTT TTC ACC TTT CCC TCA CGG TAC-3') |
| <i>Fragmento B</i> | 23S – 2F (5'-GCG AAA TCG GAA GAG GCC AAA C-3') 23S – 2R (5'-CAC CGC TAG CCA CAA GTC ATC C-3') |
| <i>Fragmento C</i> | 23S – 3F (5'-GGT GAT CTA GCC ATG AGC AG-3') 23S – 3R (5'-CCA TCG GCT ACG CTT TTC AGC C-3') |
| <i>Fragmento D</i> | 23S – 4F (5'-GTA ACG TTT CGA AGT GAG AAT C-3') 23S – 4R (5'-CCG TTA TAG TTA CGG CCG CCG TTC-3') |
| <i>Fragmento E</i> | 23S – 5F (5'-GAC ACC TGC CCA GTG CCG GAA GG-3') 23S – 5R (5'-CCG TCG ATG TGA ACT CTT GGG-3') |
| <i>Fragmento F</i> | 23S – 6F (5'-GAA AGT AGG ACT TAG TGA TCC GG-3') 23S – 1F (5'- GTT CTT TGA AAA CTG AAT ATT A-3') (<i>reverse</i>) |

Amplicón: ≈ 2902 pb

| Protocolo: | Ciclo | Temperatura (°C) | Tiempo |
|------------|-------|----------------------|--------|
| I | | 94 | 2' |
| II (x 35) | | 94 | 15'' |
| | | 45 ó 55 ^a | 30'' |
| | | 72 | 2' |
| III | | 72 | 1' |

Hold: 16 °C

^a Para los fragmentos A y F se utiliza 45°C; para los restantes, 55°C.

V.3.2.3 Ramírez y colaboradores (2008). ISR - Región intergénica entre los genes ARNr 16S y 23S.

Cebadores: 16S+C (5'-CGT TCT CGG GTC TTG TAC AC-3')
 23S-B (5'-CGC AGG TTT GCA CGT CCT TCA TCG -3')

Amplificación: 400-600 pb

Protocolo:

| Ciclo | Temperatura (°C) | Tiempo |
|-----------|------------------|--------|
| I | 94 | 2' |
| II (x 35) | 94 | 15" |
| | 60 | 30" |
| | 72 | 30" |
| III | 72 | 30" |

Hold: 16 °C

V.3.2.4 Ramírez y colaboradores (2010). ISR2 - Región intergénica entre los genes ARNr 23S y 5S.

Cebadores: 23S+S (5'-GCT CTT AGT ACG AGA GG-3')
 5S-A (5'- GCT TAA CTT CTG TGT TCG GAA TGG G -3')

Amplificación: ≈ 100 pb

Protocolo:

| Ciclo | Temperatura (°C) | Tiempo |
|-----------|------------------|--------|
| I | 94 | 2' |
| II (x 35) | 94 | 15" |
| | 45 | 30" |
| | 72 | 2' |
| III | 72 | 1' |

Hold: 16 °C

V.4 OTROS

V.4.1 ANTECEDENTES DE LOS CETÁCEOS UTILIZADOS.

| Especies | Ejemplar | Sexo ^a | Estado de desarrollo ^b | Isia del varamiento ^c | Tiempo congelado ^d | Estado de conservación ^e | Mollicites identificados ^f | Porción corporal |
|--------------------------------------|----------------|-------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|---|---|
| | 1 | H | J/S | GC | nc | 3 | ND ^g | - Boca |
| Myristicell / Balainopteridae | | | | | | | | |
| <i>Balaenoptera borealis</i> | 1 | H | NC | FV | 1 m | 2 | Mycoplasma sp. CSL7529-conjunctiva zalophus | - Ano |
| | 2 | H | A | TN* | nc | 2 | ND | - Pulmón |
| | 3 | H | A | TN* | nc | 2 | ND | - Mama |
| Odontoceti / Delphinidae | | | | | | | | |
| <i>Delphinus delphis</i> | 4 | M | A | FV | 2 m | 2 | - | - |
| | 5 | M | A | FV | 6 m | 2 | - | - |
| | 6 | H | A | GC | 2 m | 2 | - | - |
| | 7 | M | J/S | LZ | nc | 3 | - | - |
| | 8 | H | NC | FV | 3 m | 3 | - | - |
| | 9 | M | A | GC | 1 m | 2 | - | - |
| | 10 | M | A | TN | nc | 3 | - | - |
| | 11 | M | NC | TN | nc | 2 | - | - |
| | 1 | H | J/S | TN | nc | 2 | ND | - Mama |
| | 2 | M | J/S | TN | nc | 2 | ND | - Ano |
| <i>Globicephala macrorhynchus</i> | 3 | H | NC | FV | nc | 3 | - | - |
| | 4 | H | NC | FV | 8 m | 2 | - | - |
| | 5 | H | A | GC | 2 d | 4 | - | - |
| | 6 | M | A | GC | nc | 2 | - | - |
| <i>Globicephala melas</i> | 1 ^h | H | H | (Almería) | | | | |
| <i>Grampus griseus</i> | 1 | M | J/S | FV | 4 m | 3 | - | - |
| <i>Lagenodelphis hosei</i> | 1 | H | NC | GC* | 7 d | 2 | - | - |
| | 1 | H | A | LZ | nc | 2 | Mycoplasma sp Phocoena C-264-GEN (97%-ISR) | - Mama, vulva |
| | 2 | M | A | GC* | 2 d | 2 | Mycoplasma sp Phocoena C-264-GEN (97%-ISR) | - Oído, ojo pulmon, genital, articulación artífrica |
| | 3 | M | A | GC | 2 d | 3 | ND | - Pleura |
| | 4 | H | A | GC* | 2 m | 1 | - | - |
| | 5 | H | A | LZ | nc | 4 | - | - |
| | 6 | H | NC | GC | 1 m | 3 | - | - |
| | 7 | M | J/S | LZ | nc | 2 | - | - |
| | 8 | H | A | GC | nc | 2 | - | - |
| | 9 | H | A | FV | nc | 3 | - | - |
| | 10 | H | J/S | GC | 5 m | 3 | - | - |
| | 11 | M | A | GO | 3 m | 3 | - | - |
| | 12 | H | J/S | FV | 2 m | 3 | - | - |
| | 13 | H | A | FV | 2 m | 4 | - | - |
| | 14 | M | A | TN | nc | 4 | - | - |
| <i>Stenella coeruleoalba</i> | | | | | | | | |

| | | | | | | | |
|-----------------------------|--------|-----|-----------|------|---|---|----------------------|
| 1 | M | J/S | LZ* | 2 m | 2 | ND | - Ano |
| 2 | M | J/S | TN | nc | 2 | - | - |
| 3 | M | A | TN | nc | 2 | - | - |
| 4 | M | A | FV* | 2 m | 2 | - | - |
| 5 | M | A | FV | 5 m | 3 | - | - |
| 6 | H | A | LZ* | nc | 2 | - | - |
| 7 | H | A | FV | 2 m | 2 | - | - |
| 8 | H | A | TN | nc | 3 | - | - |
| 9 | H | A | GC | 1 m | 3 | - | - |
| 10 | M | A | FV | nc | 3 | - | - |
| <i>Stenella frontalis</i> | | | | | | | |
| 1 | M | J/S | LZ | 10 d | 2 | ND | - Espiráculo |
| 2 | H | A | TN | nc | 2 | ND | - Mama |
| 3 ^h | 118/11 | | (Almería) | | | ND | - Pulmón, vulva, ano |
| 4 | M | A | GC | nc | 1 | - | - |
| 5 | M | A | LZ | nc | 2 | - | - |
| 6 | H | N/C | GO | nc | 3 | - | - |
| 7 | M | J/S | GC | 4 m | 2 | - | - |
| 8 | M | A | LZ | nc | 2 | - | - |
| 9 | H | N/C | TN | nc | 4 | - | - |
| <i>Tursiops truncatus</i> | | | | | | | |
| 1 | M | A | GO | 2 d | 3 | Mycoplasma sp AB703210 (98%) | - Espiráculo |
| <i>Kogilidae</i> | | | | | | | |
| <i>Kogia breviceps</i> | | | | | | | |
| 2 | M | A | GC | nc | 3 | ND | - Ojo, espiáculo |
| 3 | M | A | FV | 2 d | 3 | - | - |
| 4 | H | A | LZ | 2 d | 4 | - | - |
| 5 ^h | M | | (Almería) | | | - | - |
| 1 | H | N/C | GC | nc | 3 | ND | - Boca |
| 1 | M | N/C | GC | nc | 3 | ND | - Boca, mama |
| 2 | H | A | TN | nc | 4 | - | - |
| 3 | H | A | TN | nc | 4 | - | - |
| <i>Ziphiidae</i> | | | | | | | |
| 1 | M | A | FV | nc | 3 | ND | - Útero |
| 2 ^h | H | | (Almería) | | | - | - |
| 3 ^h | H | | (Almería) | | | - | - |
| <i>Mesoplodon europaeus</i> | | | | | | | |
| <i>Mesoplodon mirus</i> | | | | | | | |
| 1 | M | J/S | HI | nc | 2 | Acholeplasma axanthum AJ311394 (93%-fragmento del gen ARNr 16S) | - Ojo, pulmón |
| <i>Ziphius cavirostris</i> | | | | | | | |
| 1 | H | A | GR | 2 d | 3 | ND | - Pulmón |
| 2 | M | J/S | LZ | nc | 3 | ND | - Pulmón |
| 3 | H | N/C | GC | 2 d | 3 | ND | - Útero |
| 4 | H | A | LZ | nc | 2 | - | - |
| 5 | M | A | FV | nc | 4 | - | - |

^a Sexo: H= Hembra; M= Macho.

^b Estado de desarrollo: N/C= Neonato/Cría; J/S= Juvenil/Subadulto; A= Adulto. La clasificación está basada en el largo corporal total y la apariencia de las gónadas de los ejemplares según Geraci y Lounsbury (1993).

^c Isla del varamiento: GC= Gran Canaria; GO= La Gomera; GR= La Graciosa; HI= El Hierro; FV=Fuerteventura; LZ= Lanzarote; TN= Tenerife; *=ejemplar fue encontrado vivo.

^d Tiempo congelado: d= días; m= meses; nc= no congelado.

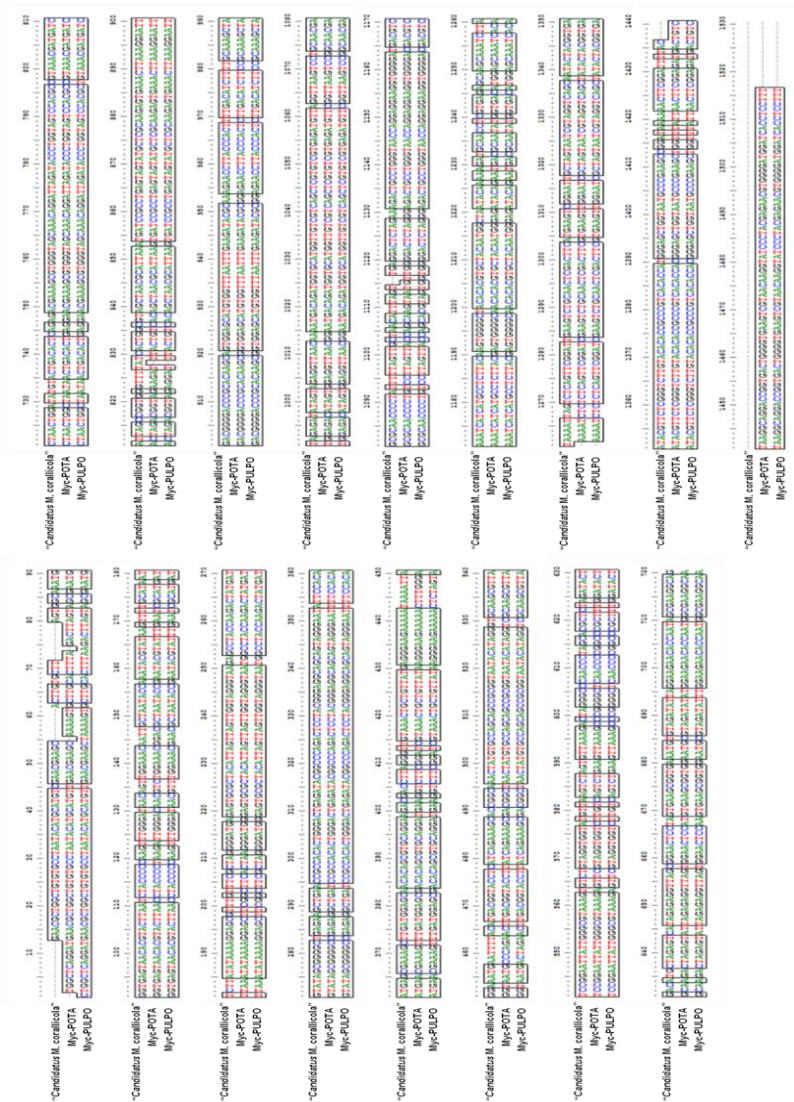
^e Estado de conservación del cuerpo al momento de la toma de muestras: 1= Muy fresco; 2= Fresco; 3=Autolítico; 4= Muy autolítico. Clasificación basada en Kuiken y García-Hartmann (1991).

^f La determinación de las muestras positivas fue mediante una PCR a tiempo real específica para la clase *Mollicutes*, adaptada de Van Kuppeveld y colaboradores (1992). La identificación de las especies de mollicutes fue conforme a la similitud que presentaban del gen ARNr 16S y/o la región entre los genes ARNr 16S y 23S (ISR) con especies ya conocidas.

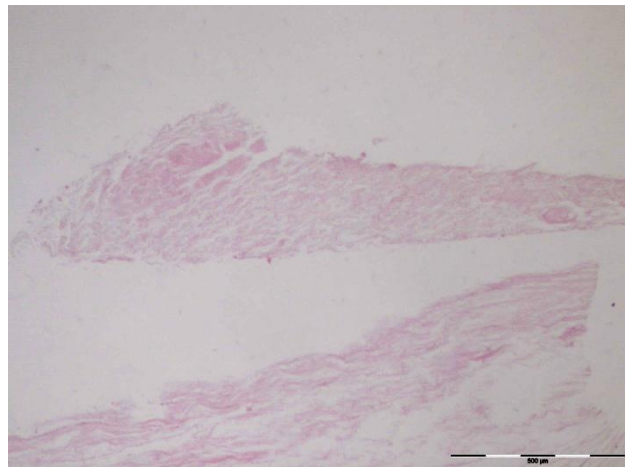
^g ND: No determinada debido a la poca cantidad de ADN disponible.

^h Sin información adicional del ejemplar.

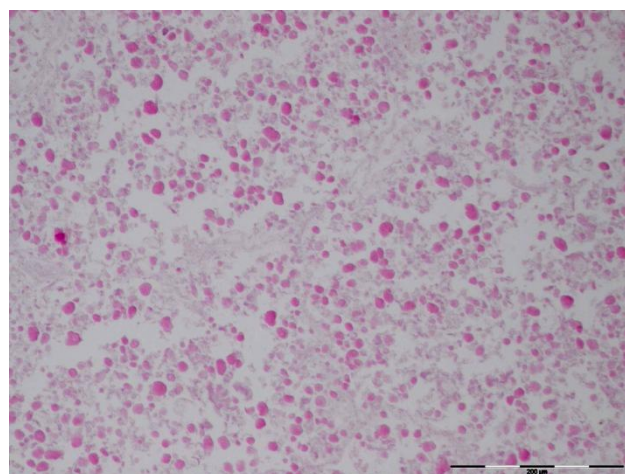
V.4.2 ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA DEL GEN ARNR 16S ENTERO DE “CANDIDATUS MYCOPLASMA CORALLICOLA”, MYC-POTA 5H Y MYC-PULPO PE.



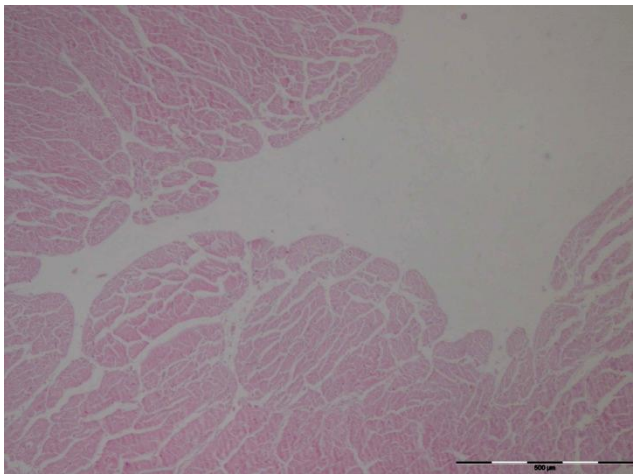
V.4.3 CORTES HISTOLÓGICOS DE POTA (*TODARODES SAGITTATUS*).



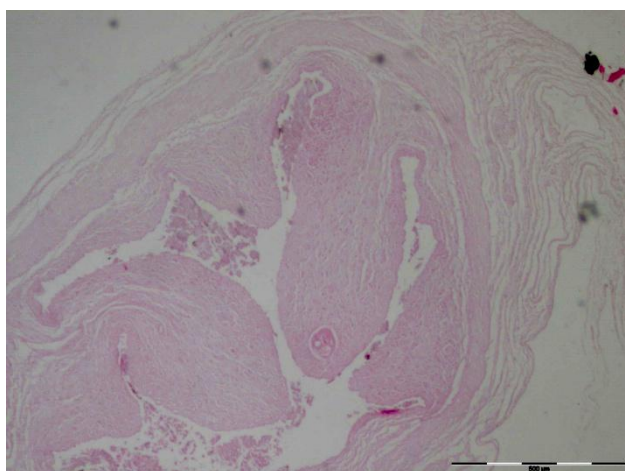
Corte transversal (40x) de la pared del esófago. Muy autolítico.



Corte transversal (100x) de la glándula digestiva.



Corte transversal (40x) de la pared del estómago.



Corte transversal (40x) de la pared del intestino.

V.4.4 COMUNICACIONES ORIGINADAS

- Vega-Orellana O.M.; Poveda J.B.; García-Peña, F.J.; García-Párraga, D.; Pedraza-Díaz, S.; Ortega-Mora, L.M.; Ramírez, A.S. 2014. “**Mollicutes Found in Pinnipeds from Deception Island (Antarctica)**”. 20th International Congress of the International Organization for Mycoplasmaology – IOM.1-6 de Junio. Blumeau, Brasil. Programs and Abstracts. (Póster).
- Vega-Orellana O.M.; Poveda J.B.; Mederos-Iriarte, L.E.; Poveda, C.; Suárez-Pérez, A.; Ramírez, A.S. 2014. “**A putative Spiroplasma isolated from jellyfish (*Pelagia noctícula*) in Canary Islands (Spain)**”. 20th International Congress of the International Organization for Mycoplasmaology – IOM.1-6 de Junio. Blumeau, Brasil. Programs and Abstracts. (Póster).
- Vega-Orellana O.M.; Poveda J.B.; Estefanell, J.; Socorro J.; Roselló-Móra, R.; Ramírez, A.S. 2014. “**A Putative Mycoplasma Isolated from Common Octopus (*Octopus vulgaris*) and its Relationship with a Mycoplasma Isolated from European Flying Squid (*Todarodes sagittatus*)**”. 20th International Congress of the International Organization for Mycoplasmaology – IOM.1-6 de Junio. Blumeau, Brasil. Programs and Abstracts. (Póster).
- Vega-Orellana, O.M., Poveda, J.B., Mederos-Iriarte, L.E., Poveda, C.G., Caballero, M.J., Betancor, M.B., Roselló-Móra, R., Ramírez, A.S. 2013. “**Mollicutes of non-mammal marine animals**”. European Mycoplasma Meeting “Mycoplasmas – a practical approach”. 6-7 de Junio. Dubrovnik, Croacia. Book of Abstract, p. 27. (Presentación oral).
- Vega-Orellana O.M., Ramírez Corbera A.S., Poveda C., Mederos-Iriarte L.E., Suárez-Pérez A., Sierra, E., Arbelo M., Fernández A., Poveda J.B. 2012. “**Mycoplasma sp Phocoena Found in Two Striped Dolphins, *Stenella***”

- coeruleoalba*, from Canary Islands (Spain)**". 19th International Congress of the International Organization for Mycoplasmaology – IOM.15-20 de Julio. Toulouse, Francia. Programs and Abstracts, p. 122. (Póster).
- Vega-Orellana O.M., Ramírez Corbera A.S., Mederos-Iriarte L.E., Poveda C., Suárez-Pérez A., Betancor, M., Caballero M.J., Poveda J.B. 2012. "**A putative mycoplasma isolated from European flying squid, *Todarodes sagittatus*, in Canary Islands (Spain)**". 19th International Congress of the International Organization for Mycoplasmaology – IOM.15-20 de Julio. Toulouse, Francia. Programs and Abstracts, p. 122. (Póster).

Referencias bibliográficas

1. **Adan-Kubo, J., Uenoyama, A., Arata, T., y Miyata, M. (2006).** Morphology of isolated Gli349, a leg protein responsible for *Mycoplasma mobile* gliding via glass binding, revealed by rotary shadowing electron microscopy. *J Bacteriol*, 188(8), pp. 2821-2828.
2. **Adan-Kubo, J., Yoshii, S., Kono, H., y Miyata, M. (2012).** Molecular structure of isolated Mvspl, a variable surface protein of the fish pathogen *Mycoplasma mobile*. *J Bacteriol*, 194(12), pp. 3050-3057.
3. **Al-Ankari, A., y Bradbury, J. (1996).** *Mycoplasma iowae*: a review. *Avian Pathol*, 25(2), pp. 205-229.
4. **Allix-Béguet, C., Harmsen, D., Weniger, T., Supply, P., y Niemann, S. (2008).** Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol*, 46(8), pp. 2692-2699.
5. **Almagor, M., Kahane, I., y Yatziv, S. (1984).** Role of superoxide anion in host cell injury induced by *Mycoplasma pneumoniae* infection. A study in normal and trisomy 21 cells. *J Clin Invest*, 73(3), pp. 842-847.
6. **Almagor, M., Kahane, I., Gilon, C., y Yatziv, S. (1986).** Protective effects of the glutathione redox cycle and vitamin E on cultured fibroblasts infected by *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect Immun*, 52(1), pp. 240-244.
7. **Altamiranda, J., Salazar, M., y Briñez, B. (2011).** Presencia de *Spiroplasma penaei* en plancton, bentos y fauna acompañante en fincas camaroneras de Colombia. *Rev MVZ Córdoba*, 16(2), pp. 2576-2583.
8. **Aluotto, B., Wittler, R., Williams, C., y Faber, J. (1970).** Standardized bacteriologic techniques for the characterization of *Mycoplasma* species. *Int J Syst Bacteriol*, 20, pp. 35-58.
9. **Arbelo-Hernández, M. (2007).** *Patología y causas de la muerte de los cetáceos varados en las Islas Canarias (1999-2005) (Tesis de Doctorado)*. Las Palmas de Gran Canaria, España: Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Referencias bibliográficas

10. **Archibald, R. (1944).** Determination of citrulline and allantoin and demonstration of citrulline in blood plasma. *J Biol Chem*, 156, pp. 121-142.
11. **Armstrong, D., Yu, B., Yagoda, A., y Kagnoff, M. (1971).** Colonization of humans by *Mycoplasma canis*. *J Infect Dis*, 124(6), pp. 607-609.
12. **Armstrong, S.E., Mariano, J.A., y Lundin, D.J. (2010).** The scope of mycoplasma contamination within the biopharmaceutical industry. *Biologicals*, 38(2), pp 211-213.
13. **Atkinson, T., Balish, M., y Waites, K. (2008).** Epidemiology, clinical manifestations, pathogenesis and laboratory detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *FEMS Microbiol Rev*, 32(6), pp. 956-973.
14. **Atlas, R. M., y Philp, J. (2005).** Bioremediation. Applied microbial solutions for real-world environmental cleanup. (R. M. Atlas, y J. Philp, Edits.) Washington: ASM Press.
15. **Atschul, S., Madden, T., Schäffer, A., y Zhang, J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleid Acids Res*, 25, pp. 3389-3402.
16. **Awan, M., Abbas, F., Yasinzai, M., Nicholas, R., Babar, S., Ayling, R., Attique, M.A., y Ahmed, Z. (2009).** Prevalence of *Mycoplasma capricolum* subspecies *capricolum* and *Mycoplasma putrefaciens* in goats in pishin district of Balochistan. *Pakistan Vet J*, 29(4), pp. 179-185.
17. **Azevedo, C. (1993).** Ocurrance of an unusual branchial *Mycoplasma*-like infection in cockle *Cerastoderma edule* (Mollusca, Bivalvia). *Dis Aquat Org*, 16, pp. 55-59.
18. **Baczynska, A., Svenstrup, H., Fedder, J., Birkelund, S., y Christiansen, G. (2004).** Development of real-time PCR for detection of *Mycoplasma hominis*. *BMC Microbiol*, 4, pp. 35-48.
19. **Baker, A., Ruoff, K., y Madoff, S. (1998).** Isolation of *Mycoplasma* species from a patient with seal finger. *Clin Infect Dis*, 27, pp. 1168-1170.

20. **Balish, M. (2006).** Subcellular structures of Mycoplasmas. *Front Biosci*, 11, pp. 2017-2027.
21. **Balish, M., y Krause, D. (2006).** Mycoplasmas: a distinct cytoskeleton for wall-less bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 11(3-5), pp. 244-255.
22. **Bano, N., Smith, A., Bennett, W., Vasquez, L., y Hollibaugh, J. (2007).** Dominance of *Mycoplasma* in the guts of the Long-Jawed Mudsucker, *Gillichthys mirabilis*, from five California salt marshes. *Environ Microbiol*, 9(10), pp. 2636-2641.
23. **Barber, R., Porter, B., Li, Q., May, M., Clairborne, M., Allison, A., Howerth, E.W., Butler, A., Wei, S., Levine, J.M., Levine, G.J., Brown, D.R., y Schatzberg, S. (2012).** Broadly reactive polymerase chain reaction for pathogen detection in canine granulomatous meningoencephalomyelitis and necrotizing meningoencephalitis. *J Vet Intern Med*, 26(4), pp. 962-968.
24. **Barbieri, E., Paster, B. J., Hughes, D., Zurek, L., Moser, D. P., Tesken, A., y Sogin, M. L. (2001).** Phylogenetic characterization of epibiotic bacteria in the accessory nidamental gland and egg capsules of the squid *Loligo pealei* (Cephalopoda:Loliginidae). *Environ Microbiol*, 3(3), pp. 151-167.
25. **Bardy, S.L., Ng, S.Y., y Jarrell, K.F. (2003).** Prokaryotic motility structures. *Microbiology*, 149, pp. 295-304.
26. **Barile, M. (1983).** Arginine Hydrolysis. In S. Razin, y J. Tully (Eds.), *Methods in Mycoplasmaology* (Vol. I, pp. 345-349). New York: Academic Press.
27. **Barile, M., y Schimke, R. (1963).** A rapid chemical method for detecting PPLO contamination of tissue cell cultures. *Proc Soc Exp Biol Med*, 114(3), pp. 676-679.
28. **Barile, M., Schimke, R., y Riggs, D. (1966).** Presence of the arginine dihydrolase pathway in Mycoplasma. *J Bacteriol*, 91(1), pp. 189-192.
29. **Bartlett, J., y Stirling, D. (2003).** A Short History of the Polymerase Chain Reaction. In J. Bartlett, y D. Stirling (Eds.), *Methods in Molecular Biology: PCR Protocols* (2 ed., Vol. 226, pp. 3-6). Totowa: Humana Press.

Referencias bibliográficas

30. **Baseman, J., y Tully, J. (1997).** *Mycoplasmas: Sophisticated, Reemerging, and Burdened by their Notoriety. Emerg Infect Dis*, 3, pp. 21-32.
31. **Baseman, J., Cagle, M., Korte, J., Herrera, C., Rasmussen, W., Baseman, J., Rochelle, S., y Piper, J. (2004).** Diagnostic assessment of *Mycoplasma genitalium* in culture-positive women. *J Clin Microbiol*, 42(1), pp. 203-211.
32. **Beauchamp, D., da Costa, R., Premanandan, C., Burns, C., y Daniels, J. (2011).** *Mycoplasma felis*-associated meningoencephalomyelitis in a cat. *J Feline Med Surg*, 13(2), pp. 139-143.
33. **Becker, C. A., Ramos, F., Sellal, E., Moine, S., Poumarat, F., y Tardy, F. (2012).** Development of a multiplex real-time PCR for contagious agalactia diagnosis in small ruminants. *J Microbiol Methods*, 90(2), pp. 73-79.
34. **Bergonier, D., y Berthelot, X. (2008).** Mycoplasmoses of small ruminants: Contagious agalactia syndrome. *Bull Acad Vet Fr*, 161(2), pp. 167-177.
35. **Berta, A., y Churchill, M. (2012).** Pinniped Taxonomy: review of currently recognized species and subspecies, and evidence used for their description. *Mammal Rev*, 42(3), pp. 207-234.
36. **Bi, K., Huang, H., Gu, W., Wang, J., y Wang, W. (2008).** Phylogenetic analysis of Spiroplasmas from three freshwater crustaceans (*Eriocheir sinensis*, *Procambarus clarkii* and *Penaeus vannamei*) in China. *J Invertebr Pathol*, 99, pp. 57-65.
37. **Biau, A. (1997).** *Utilidad de la PCR en el diagnóstico microbiológico rutinario de las patologías infecciosas más frecuentes (Tesis de Doctorado)*. Lleida, España: Universidad de Lleida.
38. **Black, F. (1973).** Phosphatase Activity in T-*Mycoplasmas*. *Int J Syst Bacteriol*, 23, pp. 65-66.
39. **Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G., Villani, F., Andolfi, R., y Moschetti, G. (2002).** 16S-23S rDNA intergenic spacer region polymorphism of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus raffinolactis* and *Lactococcus lactis* as revealed by PCR and nucleotide sequence analysis. *Syst Appl Microbiol*, 25(4), pp. 520-527.

40. **Blanchard, A. (1997).** Mycoplasmas and HIV infection, a possible interaction through immune activation. *Wien Klin Wochenschr*, 109(14-15), pp. 590-593.
41. **Blanchard, A., y Bébéar, C. (2002).** Mycoplasmas of Humans. In S. Razin, y R. Herrmann (Eds.), *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas* (pp. 45-71). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
42. **Blanchard, A., Montagnier, L., y Gougeon, M. (1997).** Influence of microbial infections on the progression of HIV disease. *Trends Microbiol*, 5(8), pp. 326-331.
43. **Blaylock, M., Musatovova, O., Baseman, J., y Baseman, J. (2004).** Determination of infectious load of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples of human vaginal cells. *J Clin Microbiol*, 42(2), pp. 746-752.
44. **Boatman, E., y Kenny, G. (1971).** Morphology and ultrastructure of *Mycoplasma pneumoniae* spherules. *J Bacteriol*, 106(3), pp. 1005-1015.
45. **Botes, A., Peyrot, B., Olivier, A., Burger, W., y Bellstedt, D. (2005).** Identification of three novel Mycoplasma species from ostriches in South Africa. *Vet Microbiol*, 111(3-4), pp. 159-169.
46. **Bower, S., y Meyer, G. (1991).** Disease of Japanese scallops (*Patinopecten yessoensis*) caused by an intracellular bacterium. *J Shellfish Res*, 10(2), pp. 513-518.
47. **Boyle, P., Maki, J., y Mitchell, R. (1987).** Mollicute Identified in Novel Association with Aquatic Invertebrate. *Current Microbiology*, 15(2), pp. 85-89.
48. **Bradbury, J. M. (1983).** Phosphatase activity. In S. Razin, y J. Tully (Eds.), *Methods in Mycoplasmaology* (Vol. I, pp. 363-366). New York: Academic Press.
49. **Bradbury, J. M. (1977).** Rapid biochemical tests for characterization of the Mycoplasmatales. *J Clin Microbiol*, 5, pp. 531-534.
50. **Bradbury, J. M. (2005).** Poultry Mycoplasmas: sophisticated pathogens in simple guise. *Brit Poultry Sci*, 46(2), pp. 125-136.
51. **Bradbury, J., y Kleven, S. (2008).** *Mycoplasma iowae* infection. In Y. Saif, A. Fadly, J. Glisson, L. McDougal, L. Nolan, y D. Swayne (Eds.), *Diseases of Poultry* (12 ed., pp. 856-862). Ames: Blackwell Publishing.

Referencias bibliográficas

52. **Bredt, W., y Radestock, U. (1977).** Gliding motility of *Mycoplasma pulmonis*. *J Bacteriol*, 130(2), pp. 937-938.
53. **Bredt, W., Höfling, K., Heunert, H., y Milthaler, B. (1970).** Measurements on motile cells of *Mycoplasma pneumoniae*. *Z Med Mikrobiol Immunol*, 156(1), pp. 39-43.
54. **Brown, D. (2010).** Phylum XVI. *Tenericutes* Murray 1984a, 356vp. In N. Krieg, J. Staley, D. Brown, B. Hedlund, B. Paster, N. Ward, W. Ludwig, y W. Whitman (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. IV, p. 567). New York: Springer.
55. **Brown, D., Bradbury, J., y Johansson, K. (2010A).** Family I. *Anaeroplasmataceae* Robinson and Freundt 1987, 80VP. In N. Krieg, J. Staley, D. Brown, B. Hedlund, B. Paster, N. Ward, W. Ludwig, y W. Whitman (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. IV, pp. 720-723). New York: Springer.
56. **Brown, D., Bradbury, J., y Johansson, K. (2010B).** Genus I. *Acholeplasma* Edward and Freundt 1970, 1AL. In N. Krieg, J. Staley, D. Brown, B. Hedlund, B. Paster, N. Ward, W. Ludwig, y W. Whitman (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. IV, pp. 688-696). New York: Springer.
57. **Brown, D., Bradbury, J., y Whitcomb, R. (2010C).** Genus I. *Entomoplasma* Tully, Bové, Laigret and Whitcomb 1993, 379VP. In N. Krieg, J. Staley, D. Brown, B. Hedlund, B. Paster, N. Ward, W. Ludwig, y W. Whitman (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. IV, pp. 646-649). New York: Springer.
58. **Brown, D., Bradbury, J., y Whitcomb, R. (2010D).** Genus II. *Mesoplasma* Tully, Bové, Laigret and Whitcomb 1993, 380VP. In N. Krieg, J. Staley, D. Brown, B. Hedlund, B. Paster, N. Ward, W. Ludwig, y W. Whitman (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. IV, pp. 649-653). New York: Springer.
59. **Brown, D., May, M., Bradbury, J., y Johansson, K. (2010E).** Class I. *Mollicutes* Edward and Freundt 1967, 267. In N. Krieg, J. Staley, D. Brown, B. Hedlund, B. Paster, N. Ward, W. Ludwig, y W. Whitman (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. IV, pp. 568-573). New York: Springer.
60. **Brown, D., May, M., Bradbury, J., Balish, M., Calcutt, M., Glass, J., Tasker., S., Messick, J.B., Johansson, K.E., y Neimark, H. (2010F).** Genus I.

- Mycoplasma* nowak 1929, 1349 nom. cons. Jud. comm. opin. 22, 1958, 166. In N. Krieg, J. Staley, D. Brown, B. Hedlund, B. Paster, N. Ward, W. Ludwig, y W. Whitman (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2 ed., Vol. IV, pp. 575-613). New York: Springer.
61. **Brown, D., Newman, J.A., Gutekunst, J.M., McManus, J.B., Letham, D.L.D., Weber, T.J., Mamalat, G., Bruk, N., Montgomery, L.K., Thompson, S., y Hantman, M.J. (2009).** Assay validation for rapid detection of mycoplasma contamination, an application of fluorescent probe technology and amplification of specific nucleic acids. *BioProcess International*, 7(4), pp. 30-40.
62. **Brown, D., Tasker, S., Messick, J., y Neimark, H. (2010G).** Genus I. *Eperythrozoon* Schilling 1928, 293. In N. Krieg, J. Staley, D. Brown, B. Hedlund, B. Paster, N. Ward, W. Ludwig, y W. Whitman (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. IV, pp. 640-642). New York: Springer.
63. **Brown, D., Tasker, S., Messick, J., y Neimark, H. (2010H).** Genus II. *Haemobartonella* Tyzzer and Weinman 1939, 305AL. In N. Krieg, J. Staley, D. Brown, B. Hedlund, B. Paster, N. Ward, W. Ludwig, y W. Whitman (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. IV, pp. 642-644). New York: Springer.
64. **Burgher, Y., Lobo, E., y Corona, B. (2013).** *Controles internos para la detección de micoplasmas contaminantes por PCR.* Obtenido de <http://www.monografias.com/trabajos84/controles-internos-deteccion-micoplasmas-contaminantes-pcr/controles-internos-deteccion-micoplasmas-contaminantes-pcr.shtml>
65. **Calderón-Copete, S., Wigger, G., Wunderlin, C., Schmidheini, T., Frey, J., Quail, M. A., y Falquet, L. (2009).** The *Mycoplasma conjunctivae* genome sequencing, annotation and analysis. *BMC Bioinformatics*, 10(6), p. S7.
66. **Carrillo, M., Tejedor, M., y Ramos, J. (2006).** *Análisis del estado de conservación de las costas y áreas marinas de la isla de Tenerife. Proyecto de Voluntariado Ambiental Monachus. Resultados-2006.* Santa Cruz de Tenerife: Fundación Global Nature–Tenerife Conservación. Área de Medio Ambiente y Paisaje. Cabildo Insular de Tenerife.
67. **Casin, I., Vexiau-Robert, D., De La Salmonière, P., Eche, A., Grandry, B., y Janier, M. (2002).** High prevalence of *Mycoplasma genitalium* in the lower genitourinary tract of women attending a sexually transmitted disease clinic in Paris, France. *Sex Transm Dis*, 29(6), pp. 353-359.

Referencias bibliográficas

68. **Castellanos-Martínez, S., y Gestal, C. (2013).** Pathogens and immune response of cephalopods. *J Exp Mar Biol Ecol*, 447, pp. 14-22.
69. **Cazanave, C., Charron, A., Reanudín, H., y Bébéar, C. (2012).** Method comparison for molecular typing of French and Tunisian *Mycoplasma genitalium*-positive specimens. *J Med Microbiol*, 61(4), pp. 500-506.
70. **Chaiyapechara, S., Rungrassamee, W., Suriyachay, I., Kuncharin, Y., Klanchui, A., Karoonuthaisiri, N., y Jiravanichpaisal, P. (2011).** Bacterial Community Associated with the Intestinal Tract of *P. monodon* in Commercial Farms. *Microb Ecol, On line: DOI 10.1007/s00248-011-9936-2*.
71. **Chalker, V. (2005).** Canine Mycoplasmas. *Res Vet Sci*, 79, pp. 1-8.
72. **Chalker, V., y Brownlie, J. (2004).** Taxonomy of the canine Mollicutes by 16S rRNA gene and 16S/23S rRNA intergenic spacer region sequence comparison. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54(2), pp. 537-542.
73. **Chambaud, I., Heilig, R., Ferris, S., Barbe, V., Samson, D., Galisson, F., Moszer, I., Dybvig, K., Wróblewski, H., Viari, A., Rocha, E.P.C., y Blanchard, A. (2001).** The complete genome sequence of the murine respiratory pathogen *Mycoplasma pulmonis*. *Nucleic Acids Res*, 29(10), pp. 2145-2153.
74. **Chambaud, I., Wróblewski, H., y Blanchard, A. (1999).** Interactions between *Mycoplasma* lipoproteins and the host immune system. *Trends Microbiol*, 7(12), pp. 493-499.
75. **Chan, M., Maiden, M., y Spratt, B. (2001).** Database-driven multi locus sequence typing (MLST) of bacterial pathogens. *Bioinformatics*, 17(11), pp. 1077-1083.
76. **Chen, J., Lou, D., y Yang, J. (2011).** Isolation and Identification of *Acholeplasma* sp. from the Mud Crab, *Scylla serrata*. *Evid Based Complement Alternat Med, On line: Doi 10.1155/2011/209406*.
77. **Chen, J., Yang, J., Lou, D., Juan, X., y Wu, S. (2011).** A Reo-like virus associated with high mortality rates in cultured mud crab, *Scylla serrata*, in East China. In M. Bondad-Reantaso, J. Jones, F. Corsin, y T. Aoki (Eds.), *Diseases in Asian Aquaculture VII* (pp. 111-118). Selangor, Malaysia: Asian Fisheries Society.

78. **Cherif, A., Borin, S., Rizzi, A., Ouzari, H., Boudabous, A., y Daffonchio, D. (2003).** Bacillus anthracis diverges from related clades of the *Bacillus cereus* group in 16S-23S ribosomal DNA intergenic transcribed spacers containing tRNA genes. *Appl Environ Microbiol*, 69(1), pp. 33-40.
79. **Chernov, V., Chernova, O., Mouzykantov, A., Baranova, N., Gorshkov, O., Trushin, M., Nesterova, T.A., y Ponomareva, A. (2012).** Extracellular membrane vesicles and phytopathogenicity of *Acholeplasma laidlawii* PG8. *ScientificWorldJournal*, 2012, pp. 1-6.
80. **Cherry, J., Ley, D., y Altizer, S. (2006).** Genotypic analyses of *Mycoplasma gallisepticum* isolates from songbirds by random amplification of polymorphic DNA and amplified-fragment length polymorphism. *J Wildl Dis*, 42(2), pp. 421-428.
81. **Choi, D., Sohn, S., Park, M., Heo, M., y Renault, T. (1996).** Detection of a mollicute-like organism in kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*. *J Fish Pathol*, 9(1), pp. 33-40.
82. **Christensen, H., Møller, P. L., Vogensen, F. K., y Olsen, J. E. (2000).** 16S to 23S rRNA spacer fragment length polymorphism of *Salmonella enterica* at subspecies and serotype levels. *J Appl Microbiol*, 89(1), pp. 130-136.
83. **Cirillo, V., y Razin, S. (1973).** Distribution of a phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system in mycoplasmas. *J Bacteriol*, 113(1), pp. 212-217.
84. **Citti, C., y Blanchard, A. (2013).** Mycoplasmas and their host: emerging and re-emerging minimal pathogens. *Trends Microbiol*, 21(4), pp. 196-203.
85. **Cohen, P., y Brown, G. (1960).** Ammonia metabolism and urea biosynthesis. *Comp Biochem*, 2, pp. 161-164.
86. **Conrads, G., Claros, M. C., Citron, D. M., Tyrrell, K. L., Merriam, V., y Goldstein, E. J. (2002).** 16S-23S rDNA internal transcribed spacer sequences for analysis of the phylogenetic relationships among species of the genus *Fusobacterium*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52(2), pp. 493-499.

Referencias bibliográficas

87. **Cooper, M. F., y Morita, R. Y. (1972).** Interaction of salinity and temperature on net protein synthesis and viability of *Vibrio marinus*. *Limnol Oceanogr*, 17(4), pp. 556-565.

88. **Cousin-Allery, A., Charron, A., de Barbeyrac, B., Fremy, G., Skov Jensen, J., Renaudin, H., y Bebear, C. (2000).** Molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae* strains by PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis. Application to French and Danish isolates. *Epidemiol Infect*, 124(1), pp. 130-111.

89. **Cowan, D., House, C., y House, J. A. (2001).** Public Health. In L. A. Dierauf, y F. M. Gulland (Eds.), *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine* (2 ed., pp. 767-778). Boca Raton: CRC Press.

90. **Crosse, P., Ayling, R., Whitehead, C., Szladovits, B., English, K., Bradley, D., y Solano-Gallego, L. (2012).** First detection of 'Candidatus Mycoplasma haemolamae' infection in alpacas in England. *Vet Rec*, 171(3), pp. 71-75.

91. **Dagleish, M., Barley, J., Howie, F., Reid, R., Herman, J., y Foster, G. (2007).** Isolation of Brucella species from a diseased atlanto-occipital joint of an Atlantic white-sided dolphin (*Lagenorhynchus acutus*). *Vet Rec*, 160(25), pp. 876-878.

92. **DaMassa, A., Wakenell, P., y Brooks, D. (1992).** Mycoplasmas of goats and sheep. *J Vet Diagn Invest*, 4, pp. 101-113.

93. **Daniels, C., y Breitbart, M. (2012).** Bacterial communities associated with the ctenophores *Mnemiopsis leidyi* and *Beroe ovata*. *FEMS Microbiol Ecol*, 82(1), pp. 90-101.

94. **Darzi, M., Sood, N., Gupta, P., y Banga, H. (1998).** The pathogenicity and pathogenesis of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* (F38) in the caprine mammary gland. *Vet Res Commun*, 22(3), pp. 155-165.

95. **Davis, J., Fricke, W., Hamann, M., Esquenazi, E., Dorrestein, P., y Hill, R. (2013).** Characterization of the bacterial community of the chemically defended Hawaiian sacoglossan *Elysia rufescens*. *Appl Environ Microbiol*, 79(22), pp. 7073-7081.

96. **Davison, N., Barnett, J., Perrett, L., Dawson, C., Perkins, M., Deaville, R., y Jepson, P. (2013).** Meningoencephalitis and arthritis associated with Brucella

- ceti in a short-beaked common dolphin (*Delphinus delphis*). *J Wildl Dis*, 49(3), pp. 632-636.
97. **de Blas, I. (2006)**. *Win Episcopo*. Obtenido de <http://www.winepi.net/>.
98. **Dégrange, S., Renaudin, H., Charron, A., Pereyre, S., Bébéar, C., y Bébéar, C.M. (2008)**. Reduced susceptibility to tetracyclines is associated in vitro with the presence of 16S rRNA mutations in *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*, 61(6), pp. 1390-1392.
99. **Del Giudice, R., Robillard, N., y Carski, T. (1967)**. Immunofluorescence identification of Mycoplasma on agar by use of incident illumination. *J Bacteriol*, 93(4), pp. 1205-1209.
100. **Deng, S., Hiruki, C., Robertson, J., y Stemke, G. (1992)**. Detection by PCR and Differentiation by Restriction Fragment Length Polymorphism of Acholeplasma, Spiroplasma, Mycoplasma, and Ureaplasma, Based upon 16S rRNA Genes. *PCR Methods Appl*, 1, pp. 202-204.
101. **Ding, Z., Bi, K., Wu, T., Gu, W., Wang, W., y Chen, J. (2007)**. A simple PCR method for the detection of pathogenic spiroplasmas in crustaceans and environmental samples. *Aquaculture*, 265(1-4), pp. 49-54.
102. **Ding, Z., Tang, J., Xue, H., Li, J., Ren, Q., Gu, W., Meng, Q., y Wang, W. (2013)**. Quantitative detection and proliferation dynamics of a novel *Spiroplasma eriocheiris* pathogen in the freshwater crayfish, *Procambarus clarkii*. *J Invertebr Pathol.*, 115C, pp. 51-54.
103. **Dionne, M., Miller, K., Dodson, J., y Bernatchez, L. (2009)**. MHC standing genetic variation and pathogen resistance in wild Atlantic salmon. *Phil Trans R Soc B*, 364, pp. 1555-1565.
104. **Dolzani, L., Tonin, E., Lagatolla, C., y Monti-Bragadin, C. (1994)**. Typing of *Staphylococcus aureus* by amplification of the 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences. *FEMS Microbiol Lett*, 119(1-2), pp. 167-173.
105. **Dos Santos, A., Dos Santos, R., Biondo, A., Dora, J., Goldani, L., De Oliveira, S., Guimarães, A.M.S., Timenetsky, J., de Moraes, H.A., González,**

Referencias bibliográficas

- F.H.D., y Messick, J. (2008).** Hemoplasma infection in HIV-positive patient, Brazil. *Emerg Infect Dis*, 14(12), pp. 1922-1924.
106. **Drexler, H.G., y Uphoff, C.C. (2002).** Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology*, 39(2), pp. 75- 90.
107. **Dubosson, C., Conzelmann, C., Miserez, R., Boerlin, P., Frey, J., Zimmermann, W., Häni, H., y Kuhnert, P. (2004).** Development of two real-time PCR assays for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in clinical samples. *Vet Microbiol*, 102, pp. 55-65.
108. **Duguid, J. (2013).** *Lessons Learned from Validation of a Real-Time PCR Mycoplasma Test for Autologous Cell Therapy Products*. Recuperado el 15 de Abril de 2014, de American Pharmaceutical Review: <http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/148855-Lessons-Learned-from-Validation-of-a-Real-Time-PCR-Mycoplasma-Test-for-Autologous-Cell-Therapy-Products/>
109. **East, A. K., y Collins, M. D. (1993).** Molecular characterization of DNA encoding 23S rRNA and 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiol Lett*, 106(2), pp. 129-133.
110. **Edginton, M. H. (2000).** Validating PCR against the current Ph. Eur mycoplasma test. *Pharmaeuropa. Proceeding of the International Symposium. Special Issue: Mycoplasma Testing: The potentialities and role of PCR tests* (pp. 27-31). Paris, 13-14 Marzo: European Pharmacopoeia Forum.
111. **Edward, D., y Moore, W. (1975).** A method for determining the utilization of glucose by Mycoplasmas. *J Med Microbiol*, 8(3), pp. 451-454.
112. **Edward, D., Freundt, E., Chanock, R., Fabricant, J., Hayflick, L., Lemcke, R., Rezin, S., Somerson, N.L., y Wittler, R. (1967).** Recommendations on nomenclature of the order *Mycoplasmatales*. *Science*, 155(3770), pp. 1694-1696.
113. **Eldering, J. A., Felten, C., Veilleux, C. A., y Potts, B. J. (2004).** Development of a PCR method for mycoplasma testing of Chinese hamster ovary cell cultures used in the manufacture of recombinant therapeutic proteins. *Biologicals*, 32(4), pp. 183-193.

114. **Erdmann, T. (1976).** *Untersuchungen zur Morphologie, Vermehrung und Beweglichkeit von Mycoplasma gallisepticum (Tesis de Doctorado).* Mainz, Alemania: Johannes Gutenberg Universität.
115. **Erno, H., y Stipkovits, L. (1973).** Bovine Mycoplasmas: cultural and biochemical studies. I. *Acta Vet Scand*, 14(3), pp. 436-439.
116. **Espino, F., Boyra, A., Tuya, F., y Haroun, R. (2006).** *Guía visual de Especies Marinas de Canarias.* Las Palmas de Gran Canaria: OceanoGRÁFICA.
117. **European Pharmacopoeia (2011).** 2.6.7. Mycoplasmas. En *European Pharmacopoeia 7.0* (Vol. 7ª, pp. 156-161). Paris: Council Of Europe.
118. **Fablet, C., Marois, C., Dorenlor, V., Eono, F., Eveno, E., Jolly, J., Le Devendec, L.; Kobisch, M.; Madec, F., y Rose, N. (2012).** Bacterial pathogens associated with lung lesions in slaughter pigs from 125 herds. *Res Vet Sci*, 93(2), pp. 627-630.
119. **Fabricant, J., y Freundt, E. (1967).** Importance of extension and standardization of laboratory tests for the identification and classification of Mycoplasma. *Ann N Y Acad Sci*, 143(1), pp. 50-58.
120. **Farto, R., Armada, S., Montes, M., Guisande, J. A., Pérez, M., y Nieto, T. P. (2003).** *Vibrio lentus* associated with diseased wild *Octopus (Octopus vulgaris)*. *J Invertebr Pathol*, 83(2), pp. 149-156.
121. **Fernández-Gil, C., Cárdena-Rodríguez, Y., Boyra-López, A., Tuya-Cortés, F., y Haroun-Tabraue, R. (2006).** *Nuestro Mar Canario.* Las Palmas de Gran Canaria: Oceanográfica.
122. **Fernández, J., y Avendaño-Herrera, R. (2009).** Analysis of 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer of *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii* strains isolated from fish. *FEMS Microbiol Lett*, 299(2), pp. 184-192.
123. **Fernández-Piquer, J., Bowman, J., Ross, T., y Tamplin, M. (2012).** Molecular analysis of the bacterial communities in the live Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and the influence of postharvest temperature on its structure. *J Appl Microbiol*, 112(6), pp. 1134-1143.

Referencias bibliográficas

124. Fischer, A., Shapiro, B., Muriuki, C., Heller, M., Schnee, C., Bongcam-Rudloff, E., Vilei, E.M., y Jores, J. (2012). The origin of the '*Mycoplasma mycoides* cluster' coincides with domestication of ruminants. *PLoS One*, 7(4), p. e36150.
125. Fischer, M., y Kirchhoff, H. (1987). Interaction of *Mycoplasma mobile* 163K with erythrocytes. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*, 266(3-4), pp. 497-505.
126. Fischer, M., Kirchhoff, H., Rosengarten, R., Kerlen, G., y Seack, K. (1987). Gliding movement of *Mycoplasma* sp. nov. strain 163K on erythrocytes. *FEMS Microbiol Lett*, 40(2-3), pp. 321-324.
127. Fischer, M., Shirvan, M., Platt, M., Kirchhoff, H., y Rottem, S. (1988). Characterization of membrane components of the flask-shaped *Mycoplasma mobile*. *J Gen Microbiol*, 134(8), pp. 2385-2392.
128. Fischer, S., y Lerman, L. (1983). DNA Fragments Differing by Single Base-Pair Substitutions are Separated in Denaturing Gradient Gels: Correspondence with Melting Theory. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, pp. 1579-1583.
129. Forbes, B., Sahm, D. F., y Weissfeld, A. S. (2009). *Bailey & Scott: Diagnóstico Microbiológico* (12ª ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana S.A.
130. Foster, G., McAuliffe, L., Dagleish, M., Barley, J., Howie, F., Nicholas, R., y Ayling, R. (2011). *Mycoplasma* Species Isolated from Harbor Porpoises (*Phocoena phocoena*) and a Sowerby's Beaked Whale (*Mesoplodon bidens*) Stranded in Scottish Waters. *J Wildl Dis*, 47(1), pp. 206-211.
131. Franzmann, P., y Rohde, M. (1992). Characteristics of a novel, anaerobic, *Mycoplasma*-like bacterium from Ace Lake, Antarctica. *Antarctic Science*, 4(2), pp. 155-162.
132. Fraser, C., Gocayne, J., White, O., Adams, M., Clayton, R., Fleischmann, R., Bult, C.J., Kerlavage, A.R., Sutton, G., Kelley, J.M., Fritchman, R.D., Weidman, J.F., Small, K.V., Sandusky, M., Fuhrmann, J., Nguyen, D., Utterback, T.R., Saudek, D.M., Phillips, C.A., Merrick, J.M., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Bott, K.F., Hu, P.C., Lucier, T.S., Peterson, S.N., Smith, H.O., Hutchison, C.A. 3rd, y Venter, J.C. (1995). The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science*, 270, pp. 397-403.

133. **Fraune, S., y Zimmer, M. (2008).** Host-specificity of environmentally transmitted *Mycoplasma*-like isopod symbionts. *Environ Microbiol*, 10(10), pp. 2497-2504.
134. **Frelier, P., Sis, R., Bell, T., y Lewis, D. (1992).** Microscopic and Ultrastructural Studies of Necrotizing Hepatopancreatitis in Pacific White Shrimp (*Penaeus vannamei*) cultured in Texas. *Vet Pathol*, 29, pp. 269-277.
135. **Freundt, E. (1955).** The classification of the pleuropneumonia group of organisms (Borrelomycetales). *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy*, 5(2), pp. 67-78.
136. **Freundt, E. (1983).** Films and Spot production. In S. Razin, y J. Tully (Eds.), *Methods in Mycoplasmaology* (Vol. I, pp. 323-374). New York: Academic Press.
137. **Freundt, E., Andrews, B., Erno, H., Kunze, M., y Black, F. (1973).** The sensitivity of *Mycoplasma*tales to sodium-polyanethol-sulfonate and digitonin. *Zentralblatt J2r Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*, 225, pp. 104-112.
138. **Freundt, E., Erno, H., y Lemcke, R. (1979).** Identification of Mycoplasmas. In T. Bergan, y J. Norris (Eds.), *Methods in Microbiology* (Vol. 13, pp. 377-434). New York: Academic Press.
139. **Fussing, V., Paster, B. J., Dewhirst, F. E., y Poulsen, L. K. (1998).** Differentiation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains by sequence analysis of 16S rDNA and ribosomal intergenic regions, and development of a species specific oligonucleotide for in situ detection. *Syst Appl Microbiol*, 21(3), pp. 408-418.
140. **Gambini, D., Decleva, I., Lupica, L., Ghislanzoni, M., Cusini, M., y Alessi, E. (2000).** *Mycoplasma genitalium* in males with nongonococcal urethritis: prevalence and clinical efficacy of eradication. *Sex Transm Dis*, 27(4), pp. 226-229.
141. **García-Peña, F., Pérez-Boto, D., Jiménez, C., San Miguel, E., Echeita, A., Rengifo-Herrera, C., García-Párraga, D., Ortega-Mora, L.M., y Pedraza-Díaz, S. (2010).** Isolation and characterization of *Campylobacter* spp. from Antarctic fur seals (*Arctocephalus gazella*) at Deception Island, Antarctica. *Appl Environ Microbiol*, 76(17), pp. 6013-6016.

Referencias bibliográficas

142. **Gardella, R., Del Giudice, R., y Tully, J. (1983).** Immunofluorescence. In S. Razin, y J. Tully (Eds.), *Methods in Mycoplasmaology* (Vol. I, pp. 431-439). New York: Academic Press.
143. **Garner, C.M., Hubbard, L.M., y Chakraborti, P.R. (2000).** Mycoplasma detection in cell cultures: a comparison of four methods. *Br J Biomed Sci* 57(4), pp 295-300.
144. **Garrity, G., Lilburn, T., Cole, J., Harrison, S., Euzéby, J., y Tindall, B. (2007).** *The taxonomic outline of the Bacteria and Archaea. Release 7.7, Part 8: The Bacteria: Phylum "Firmicutes": Class Mollicutes.* Disponible en: <http://www.taxonomicoutline.org/index.php/toba/article/view/185/217>.
145. **Geraci, J. T., y Lounsbury, V. J. (1993).** *Marine mammals ashore: a field guide for strandings.* Galveston: Texas A&M University Sea Grant Publication.
146. **Geraci, J., St. Aubin, D., y Barker, I. (1982).** Mass mortality of harbor seals: pneumonia associated with influenza A virus. *Science*, 215, pp. 112-1131.
147. **Ghadersohi, A., y Owens, L. (1999).** Isolation, characterisation and DNA analysis of *Mycoplasma* spp. from moribund prawns *Penaeus monodon* cultured in Australia. *Dis Aquat Org*, 35, pp. 53-61.
148. **Giebel, J., Binder, A., y Kirchhoff, H. (1990).** Isolation of *Mycoplasma moatsii* from the intestine of wild Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Vet Microbiol*, 22(1), pp. 23-29.
149. **Giebel, J., Meier, J., Binder, A., Flossdorf, J., Poveda, J., Schmidt, R., y Kirchhoff, H. (1991).** *Mycoplasma phocarhinis* sp. nov. and *Mycoplasma phocacerebrale* sp. nov., Two New Species from Harbor Seals (*Phoca vitulina* L.). *Int J Syst Bacteriol*, 41(1), pp. 39-44.
150. **Gilroy, C., Keat, A., y Taylor-Robinson, D. (2001).** The prevalence of *Mycoplasma fermentans* in patients with inflammatory arthritides. *Rheumatology (Oxford)*, 40(12), pp. 1355-1358.
151. **Giono-Cerezo, S., Estrada-Gutiérrez, G., Rivera-Tapia, J. A., Yáñez-Santos, J. A., y Díaz-García, F. J. (2012).** Current Status of the Mollicute (Mycoplasma) Lung Disease: Pathogenesis, Diagnostics, Treatment and Prevention. In E.

- Irusen (Ed.), *Lung Diseases - Selected State of the Art Reviews* (pp. 331-358). Rijeka: InTech.
152. **Göbel, U., Geiser, A., y Stanbridge, E. (1987)**. Oligonucleotide Probes Complementary to Variable Regions of Ribosomal RNA Discriminate between Mycoplasma species. *J Gen Microbiol*, 133, pp. 1969-1974.
153. **Goering, R. (2010)**. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infect Genet Evol*, 10(7), pp. 866-875.
154. **Gonçalves, L., Chaiworapongsa, T., y Romero, R. (2002)**. Intrauterine infection and prematurity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 8(1), pp. 3-13.
155. **González-Barrientos, R., Morales, J., Hernández-Mora, G., Barquero-Calvo, E., Guzmán-Verri, C., Chaves-Olarte, E., y Moreno, E. (2010)**. Pathology of Striped Dolphins (*Stenella coeruleoalba*) Infected with *Brucella ceti*. *J Comp Path*, 142, pp. 347-352.
156. **Gorman, R., y Adley, C.C. (2004)**. An evaluation of five preservation techniques and conventional freezing temperatures of -20 degrees C and -85 degrees C for long-term preservation of *Campylobacter jejuni*. *Lett Appl Microbiol*, 38(4), pp. 306-310.
157. **Gourlay, R., y Howard, C. (1982)**. Respiratory mycoplasmosis. *Adv Vet Sci Comp Med*, 26, pp. 289-332.
158. **Green, T., y Barnes, A. (2010)**. Bacterial diversity of the digestive gland of Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata* infected with the paramyxean parasite, *Marteilia sydneyi*. *J Appl Microbiol*, 109(2), pp. 613-622.
159. **Green, T., Smullen, R., y Barnes, A. (2013)**. Dietary soybean protein concentrate-induced intestinal disorder in marine farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* is associated with alterations in gut microbiota. *Vet Microbiol*, 166(1-2), pp. 286-292.
160. **Greiner, M., y Gardner, I. A. (2000)**. Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. *Prev Vet Med*, 45(1-2), pp. 3-22.

Referencias bibliográficas

161. **Griffiths, A., Lewontin, R., Gelbart, W., y Miller, J. (2002).** *Modern Genetic Analysis*. New York, U.S.A.: W. H. Freeman.
162. **Groebel, K., Hoelzle, K., Wittenbrink, M., Ziegler, U., y Hoelzle, L. (2009).** *Mycoplasma suis* invades porcine erythrocytes. *Infect Immun*, 77(2), pp. 576-584.
163. **Guzmán-Verri, C., González-Barrientos, R., Hernández-Mora, G., Morales, J., Baquero-Calvo, E., Chaves-Olarte, E., y Moreno, E. (2012).** *Brucella ceti* and Brucellosis in Cetaceans. *Front Cell Infect Microbiol*, 2(3), pp. 1-22.
164. **Gwee, A., y Curtis, N. (2014).** Ureaplasma--Are you sitting comfortably? *J Infect*, 68(1), pp. S19-23.
165. **Hackett, K., y Clark, T. (1989).** The ecology of spiroplasmas. In R. Withcomb, y J. Tully (Eds.), *The Mycoplasmas* (Vol. V, pp. 113-200). New York: Academic Press.
166. **Hackett, K., Ginsberg, A. S., Rottem, S., Henegar, R. B., y Whitcomb, R. F. (1987).** A defined medium for a fastidious Spiroplasma. *Science*, 237(4814), pp. 525-527.
167. **Hall, N. (2007).** Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. *J Exp Biol*, 210(9), pp. 1518-1525.
168. **Hanlon, R., Forsythe, J., Cooper, K., Dinuzzo, A. R., Folse, D., y Kelly, M. (1984).** Fatal penetrating skin ulcers in laboratory-reared Octopuses. *J Invertebr Pathol*, 44(1), pp. 67-83.
169. **Harasawa, R. (1996).** Nested PCR: Application to the detection of *Mycoplasmas*. In J. Tully, y S. Razin (Eds.), *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology: Diagnostic Procedures* (Vol. 2, pp. 75-80). London: Academic Press.
170. **Harasawa, R., Mizusawa, H., Fujii, M., Yamamoto, J., Mukai, H., Uemori, T., Asada, K., y Kato, I. (2005).** Rapid detection and differentiation of the major mycoplasma contaminants in cell cultures using real-time PCR with SYBR Green I and melting curve analysis. *Microbiol Immunol*, 49(9), pp. 859-863.

171. Harasawa, R., Uemori, T., Asada, K., Kato, I., y Shiragami, N. (1992). 'boxA'-like sequence between the 16 S/23 S spacer in rRNA operon of *Mycoplasmas*. *FEBS Lett*, 297(3), pp. 209-211.
172. Harshbarger, J., Chang, S., y Otto, S. (1976). Chlamydiae (with Phages), *Mycoplasmas*, and Rickettsiae in Chesapeake Bay Bivalves. *Science*, 196, pp. 666-668.
173. Hatchel, J., Balish, R., Duley, M., y Balish, M. (2006). Ultrastructure and gliding motility of *Mycoplasma amphoriforme*, a possible human respiratory pathogen. *Microbiology*, 152(7), pp. 2181-2189.
174. Haulena, M., Gulland, F., Lawrence, J., Fauquier, D., Jang, S., Aldridge, B., Spraker, T., Thomas, L.C., Brown, D.R., Wendland, L., y Davidson, M. (2006). Lesions associated with a novel *Mycoplasma* sp. in California sea lions (*Zalophus californianus*) undergoing rehabilitation. *J Wildl Dis*, 42(1), pp. 40-45.
175. Hayashi, S., y Wu, H. (1990). Lipoproteins in bacteria. *J Bioenerg Biomembr*, 22(3), pp. 451-471.
176. He, Q., Marjamäki, M., Soini, H., Mertsola, J., y Viljanen, M. K. (1994). Primers are decisive for sensitivity of PCR. *Biotechniques*, 17(1), pp. 82-87.
177. Heres, A., y Lightner, D. (2010). Phylogenetic analysis of the pathogenic bacteria *Spiroplasma penaei* based on multilocus sequence analysis. *J Invertebr Pathol*, 103(1), pp. 30-35.
178. Hernández, M., Valenzuela, E., Pulido, I., Reguero, M., Restrepo, S., Trujillo, S., Quintero, L., y Mantilla, J. (2011). The genomic identification of Colombian *Acinetobacter baumannii* clinical isolates by RFLP-PCR analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region. *Rev Colomb Biotechnol*, 13(1), pp. 110-114.
179. Higgins, R. (2000). Bacteria and fungi of marine mammals: A review. *Can Vet J*, 41, pp. 105-116.
180. Hine, P., y Diggles, B. (2002). Prokaryote infections in the New Zealand scallops *Pecten novaezelandiae* and *Chlamys delicatula*. *Dis Aquat Org*, 50(2), pp. 137-144.

Referencias bibliográficas

181. **Hiratsuka, Y., Miyata, M., y Uyeda, T. (2005).** Living microtransporter by uni-directional gliding of *Mycoplasma* along microtracks. *Biochem Biophys Res Commun*, 331(1), pp. 318-324.
182. **Hiratsuka, Y., Miyata, M., Tada, T., y Uyeda, T. (2006).** A microrotary motor powered by bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(37), pp. 13618-13623.
183. **Hoelzle, K., Engels, M., Kramer, M., Wittenbrink, M., Dieckmann, S., y Hoelzle, L. (2010).** Occurrence of *Mycoplasma suis* in wild boars (*Sus scrofa* L.). *Vet Microbiol*, 143(2-4), pp. 405-409.
184. **Hoelzle, L., Hoelzle, K., Harder, A., Ritzmann, M., Aupperle, H., Schoon, H., Heinritzi, K., y Wittenbrink, M. (2007).** First identification and functional characterization of an immunogenic protein in unculturable haemotrophic *Mycoplasmas* (*Mycoplasma suis* HspA1). *FEMS Immunol Med Microbiol*, 49(2), pp. 215-223.
185. **Holben, W., Williams, P., Gilbert, M., Saarinen, M., Särkilahti, L., y Apajalahti, H. (2002).** Phylogenetic Analysis of Intestinal Microflora Indicates a Novel *Mycoplasma* Phylotype in Farmed and Wild Salmon. *Microb Ecol*, 44(2), pp. 175-185.
186. **Holbrook, J., Stabley, D., y Sol-Church, K. (2005).** Exploring Whole Genome Amplification as a DNA Recovery Tool for Molecular Genetic Studies. *J Biomol Tech*, 16(2), pp. 125-133.
187. **Hollants, J., Leliaert, F., Verbruggen, H., Willems, A., y De Clerck, O. (2013).** Permanent residents or temporary lodgers: characterizing intracellular bacterial communities in the siphonous green alga *Bryopsis*. *Proc R Soc B*, 280, p. 20122659.
188. **Hopert, A., Uphoff, C., Wirth, M., Hauser, H., y Drexler, H. (1993).** *Mycoplasma* detection by PCR analysis. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 29A, 819-821.
189. **Hotzel, H., Frey, J., Bashiruddin, J., y Sachse, K. (2003).** Detection and Differentiation of Ruminant *Mycoplasmas*. In K. Sachse , y J. Frey (Eds.), *Methods in Molecular Biology - PCR Detection of Microbial Pathogens: Methods and Protocols* (Vol. 216, pp. 231-245). Totowa, NJ, USA: Humana Press Inc.

190. **Howard, C., y Gourlay, R. (1978).** Mycoplasmas of animals. *Sci Prog*, 65(259), pp. 313-329.
191. **Huang, J., Zhang, J., Song, T., y Xie, X. (2013).** Research progress in pathogenicity of *Ureaplasma urealyticum* [Resumen en inglés]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 42(4), pp. 464-471.
192. **Huang, S., Li, J., Wu, J., Meng, L., y Shou, C. (2001).** Mycoplasma infections and different human carcinomas. *World J Gastroenterol*, 7(2), pp. 266-269.
193. **Huang, Z., Guo, F., Zhao, J., Li, W., y Ke, C. (2010).** Molecular analysis of the intestinal bacterial flora in cage-cultured adult small abalone, *Haliotis diversicolor*. *Aquac Res*, 41, pp. e760-e769.
194. **Huggett, A., y Nixon, D. (1957).** Use of glucose oxidase, peroxidase, and O-dianisidine in determination of blood and urinary glucose. *Lancet*, 270(6991), pp. 368-370.
195. **Hum, S., Kessell, A., Djordjevic, S., Rheinberger, R., Hornitzky, M., Forbes, W., y Gonsalves, J. (2000).** Mastitis, polyarthritis and abortion caused by *Mycoplasma* species bovine group 7 in dairy cattle. *Aust Vet J*, 78(11), pp. 744-750.
196. **Hunt, T., Ziccardi, M., Gulland, F., y Yochem, P. (2008).** Health risks for marine mammal workers. *Dis Aquat Org*, 81, pp. 81-92.
197. **Iehata, S., Valenzuela, F., y Riquelme, C. (2013).** Analysis of bacterial community and bacterial nutritional enzyme activity associated with the digestive tract of wild Chilean Octopus (*Octopus mimus* Gould, 1852). *Aquac Res*, pp. 1-13.
198. **Ilha, M., Rajeev, S., Watson, C., y Woldemeskel, M. (2010).** Meningoencephalitis caused by *Mycoplasma edwardii* in a dog. *J Vet Diagn Invest*, 22(5), pp. 805-808.
199. **Indra, A., Blaschitz, M., Kernbichler, S., Reischl, U., Wewalka, G., y Allerberger, F. (2010).** Mechanisms behind variation in the *Clostridium difficile* 16S-23S rRNA intergenic spacer region. *J Med Microbiol*, 59(11), pp. 1317-1323.

Referencias bibliográficas

200. Ishikawa, Y., Kozakai, T., Morita, H., Saida, K., Oka, S., y Masuo, Y. (2006). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures using SYBR Green-based real-time polymerase chain reaction. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 42(3-4), pp. 63-69.
201. Jaffe, J. D., Stange-Thomann, N., Smith, C., DeCaprio, D., Fisher, S., Butler, J., Calvo, S., Elkins, T., FitzGerald, M.G., Hafez, N., Kodira, C.D., Major, J., Wang, S., Wilkinson, J., Nicol, R., Nusbaum, C., Birren, B., Berg, H.C., y Church, G. (2004). The complete genome and proteome of *Mycoplasma mobile*. *Genome Res*, 14(8), pp. 1447-1461.
202. Jaffe, J., Miyata, M., y Berg, H. (2004). Energetics of gliding motility in *Mycoplasma mobile*. *J Bacteriol*, 186(13), pp. 4254-4261.
203. Japanese Pharmacopoeia. (2006). Mycoplasma testing for cell substrates used for the production of biotechnological/biological products. En *Japanese Pharmacopoeia Fifteenth Edition* (Vol. 9, pp. 1316-1319). Hong Kong: Ministry of Health, Labour and Welfare from Japan.
204. Jarrell, K., y Mc Bride, M. (2008). The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat Rev Microbiol*, 6(6), pp. 466-476.
205. Jasper, D. E., Boothby, J. T., y Thomas, C. (1987). Pathogenesis of bovine Mycoplasma mastitis. *Isr J Med Sci*, 23(6), pp. 625-627.
206. Jensen, J. (2004). *Mycoplasma genitalium*: the aetiological agent of urethritis and other sexually transmitted diseases. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 18(1), pp. 1-11.
207. Jensen, J., Borre, M., y Dohn, B. (2003). Detection of *Mycoplasma genitalium* by PCR amplification of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol*, 41(1), pp. 261-266.
208. Jensen, J. S., Bruun, B., y Gahrn-Hansen, B. (1999). Unexpected cross-reaction with *Fusobacterium necrophorum* in a PCR for detection of mycoplasmas. *J Clin Microbiol*, 37(3), pp. 828-829.
209. Jifang, Y. (1998). Ultrastructure of a mollicute associated, gut-node disease of penaeid shrimp (*Penaeus chinensis*). In T. Flegel (Ed.), *Advances in shrimp biotechnology* (pp. 237-240). Bangkok: National Center for Genetic Engineering and Biotechnology.

210. **Jiménez, R., Barniol, R., Romero, X., y Machuca, M. (1998).** A prokaryotic intracellular organism in the cuticular epithelium of cultured crayfish, *Cherax quadricarinatus* (von Martens), in Ecuador. *J Fish Dis*, 21, pp. 387-390.
211. **Johansson, K., y Pettersson, B. (2002).** Taxonomy of Mollicutes. In S. Razin, y R. Herrmann (Eds.), *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas* (pp. 1-27). New York: Kluwer.
212. **Johansson, K., Healdtander, M., y Pettersson, B. (1998).** Characterization of Mycoplasmas by PCR and sequence analysis with universal 16S rDNA primers. In R. Miles, y R. Nicholas (Eds.), *Methods in Molecular Biology* (Vol. 104, pp. 145-165). New York: Humana Press.
213. **Jones, A. L., Whitcomb, R. F., Williamson, D. L., y Coan, M. E. (1977).** Comparative Growth and Primary Isolation of Spiroplasmas in Media Based on Insect Tissue Culture Formulations. *Phytopathology*, 67, pp. 738-746.
214. **Kahane, I., y Tully, J. (1976).** Binding of plant lectins to Mycoplasma cells and membranes. *J Bacteriol*, 128(1), pp. 1-7.
215. **Kang, I., Kim, D., Han, K., Seo, H. W., Oh, Y., Park, C., Lee, J.; Gottschalk, M., y Chae, C. (2012).** Optimized protocol for multiplex nested polymerase chain reaction to detect and differentiate *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, and *Mycoplasma hyorhinis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues from pigs with polyserositis. *Can J Vet Res*, 76(3), pp. 195-200.
216. **Kasai, T., Nakane, D., Ishida, H., Ando, H., Kiso, M., y Miyata, M. (2013).** Role of binding in *Mycoplasma mobile* and *Mycoplasma pneumoniae* gliding analyzed through inhibition by synthesized sialylated compounds. *J Bacteriol*, 195(3), pp. 429-435.
217. **Kasprzykowska, U., Elias, J., Elias, M., Mączyńska, B., y Sobieszcańska, B. (2013).** Colonization of the lower urogenital tract with *Ureaplasma parvum* can cause asymptomatic infection of the upper reproductive system in women: a preliminary study. *Arch Gynecol Obstet*, pp. Online: DOI 10.1007/s00404-013-3102-7.
218. **Keane, F., Thomas, B., Gilroy, C., Renton, A., y Taylor-Robinson, D. (2000).** The association of *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* and

Referencias bibliográficas

- Mycoplasma genitalium* with bacterial vaginosis: observations on heterosexual women and their male partners. *Int J STD AIDS*, 11(6), pp. 356-360.
219. **Kellogg, C., Lisle, J., y Galkiewicz, J. (2009).** Culture-Independent Characterization of Bacterial Communities Associated with the Cold-Water Coral *Lophelia pertusa* in the Northeastern Gulf of Mexico. *Appl Environ Microbiol*, 75(8), pp. 2294-2303.
220. **Kerstens, K., Pot, B., Dewettinck, D., Torck, U., Vancanneyt, M., Vauterin, L., y Vandamme, P. (1994).** Identification and typing of bacteria by protein electrophoresis. In F. Priest, A. Ramos-Cormenzana, y B. Tyndall (Eds.), *Bacterial diversity and systematics* (pp. 51-66). New York: Plenum Press .
221. **Kim, D., Brunt, J., y Austin, B. (2007).** Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Appl Microbiol*, 102(6), pp. 1654-1664.
222. **Kilic, A., Kalender, H., Eroksuz, H., Muz, A., y Tasdemir, B. (2013).** Identification by culture, PCR, and immunohistochemistry of mycoplasmas and their molecular typing in sheep and lamb lungs with pneumonia in Eastern Turkey. *Trop Anim Health Prod*, 45(7), pp. 1525-1231.
223. **Kim, J., Chung, H., y Chae, C. (2003).** Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *Vet J*, 166(3), pp. 251-256.
224. **King, G., Judd, C., Kuske, C., y Smith, C. (2012).** Analysis of stomach and gut microbiomes of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) from coastal Louisiana, USA. *PLoS One* , 7(12), p. e51475.
225. **Kirchhoff, H., y Rosengarten, R. (1984).** Isolation of a motile Mycoplasma from fish. *J Gen Microbiol*, 130(9), pp. 2439-2445.
226. **Kirchhoff, H., Beyene, P., Fischer, M., Flossdorf, J., Heitmann, J., Khattab, B., Lopatta, D., Rosengarten, R., Seidel, G., y Yousef, C. (1987).** *Mycoplasma mobile* sp nov., a New Specie from Fish. *Int J Syst Bacteriol*, 37, pp. 192-197.
227. **Kirchhoff, H., Binder, A., Liess, B., Friedhoff, K., Pohlenz, J., Stede, M., y Willhaus, T. (1989).** Isolation of Mycoplasmas from diseased seals. *Vet Rec*, 124, pp. 513-514.

228. **Kirchhoff, H., Boldt, U., Rosengarten, R., y Klein-Struckmeier, A. (1987).** Chemotactic response of a gliding *Mycoplasma*. *Curr Microbiol*, 15, pp. 57-60.
229. **Kirchhoff, H., Rosengarten, R., Lotz, W., Fischer, M., y Lopatta, D. (1984).** Flask-shaped Mycoplasmas: properties and pathogenicity for man and animals. *Isr J Med Sci*, 20(9), pp. 848-853.
230. **Kleven, S. (1998).** *Mycoplasmas* in the etiology of multifactorial respiratory disease. *Poultry Sci*, 77(8), pp. 1146-1149.
231. **Klienenberger, E. (1935).** The natural occurrence of pleuropneumonia-like organisms in apparent symbiosis with *Streptobacillus moniliformis* and other bacteria. *J Path Bat*, 40, pp. 93-105.
232. **Kobisch, M., y Friis, N. (1996).** Swine mycoplasmoses. *Rev Sci Tech*, 15(4), pp. 1569-1605.
233. **Kobisch, M., y Marois, C. (2008).** Swine mycoplasmoses. *Bull Acad Vet Fr*, 161(2), pp. 179-184.
234. **Kokotovic, B., Friis, N., y Ahrens, P. (2002).** Characterization of *Mycoplasma hyosynoviae* strains by amplified fragment length polymorphism analysis, pulsed-field gel electrophoresis and 16S ribosomal DNA sequencing. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 49(5), pp. 245-252.
235. **Kong, H., Volokhov, D. V., George, J., Ikonomi, P., Chandler, D., Anderson, C., y Chizhikov, V. (2007).** Application of cell culture enrichment for improving the sensitivity of mycoplasma detection methods based on nucleic acid amplification technology (NAT). *Appl Microbiol Biotechnol*, 77(1), pp. 223-232.
236. **Königsson, M., Pettersson, B., y Johansson, K. (2001).** Phylogeny of the seal Mycoplasmas *Mycoplasma phocae* corrig., *Mycoplasma phocicerebrale* corrig. and *Mycoplasma phocirhinis* corrig. based on equence analysis of 16S rDNA. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51, pp. 1389-1393.
237. **Krause, C., y Taylor-Robinson, D. (1992).** Mycoplasmas which infect humans. In J. Maniloff, R. Mc Elhaney, L. Finch, y J. Baseman (Eds.), *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis* (pp. 417-444). Washington DC: American Society for Microbiology.

Referencias bibliográficas

238. **Krogdahl, A., y Bakke-McKellep, A. (2005).** Fasting and refeeding cause rapid changes in intestinal tissue mass and digestive enzyme capacities of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Comp Biochem Physiol*, 141(4), pp. 450-460.
239. **Krol, R., Hawkins, W., y Overstreet, R. (1991).** Rickettsial and mollicute infections in hepatopancreatic cells of cultured Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *J Invertebr Pathol*, 57, pp. 362-370.
240. **Kuiken, T., y García-Hartmann, M. (1991).** Proc 1st ECS Workshop on cetacean pathology: dissection techniques and tissue sampling. *ECS Newsletter 17 - special issue* (p. 39). Saskatoon, Canadá: European Cetacean Society.
241. **L'Abée-Lund, T., Heiene, R., Friis, N., Ahrens, P., y Sørum, H. (2003).** *Mycoplasma canis* and urogenital disease in dogs in Norway. *Vet Rec*, 153(8), pp. 231-235.
242. **Leach, R. (1983).** Preservation of Mycoplasma cultures and culture collections. In S. Razin, y J. Tully (Eds.), *Methods in Mycoplasmaology* (Vol. I, pp. 197-204). New York: Academic Press.
243. **Leclercq, S., Dittmer, J., Bouchon, D., y Cordaux, R. (2014).** Phylogenomics of 'Candidatus Hepatoplasma crinochetorum', a lineage of Mollicutes associated with non-insect arthropods. *Genome Biol Evol*, p. Disponible online (in press).
244. **Lee, I. M., y Davis, R. (1983).** Chemically defined medium for cultivation of several epiphytic and phytopathogenic spiroplasmas. *Appl Environ Microbiol*, 46(6), pp. 1247-1251.
245. **Lemcke, R. (1979).** Equine *Mycoplasmas*. In J. Tully, y R. Whitcomb (Eds.), *The Mycoplasmas* (Vol. II, pp. 177-189). New York, U.S.A.: Academic Press.
246. **Lerman, L., y Beldjord, C. (1999).** Comprehensive mutation detection with denaturing gradient gel electrophoresis. In R. Cotton, E. Edkins, y S. Forrest (Eds.), *Mutation Detection* (pp. 35-61). New York: Oxford University Press.
247. **Lesnoff, M., Laval, G., Bonnet, P., Abdicho, S., Workalemahu, A., Kifle, D., Peyraud, A., Lancelot, R., y Thiaucourt, F. (2004).** Within-herd spread of

- contagious bovine pleuropneumonia in Ethiopian highlands. *Prev Vet Med*, 64(1), pp. 27-40.
248. **Liang, T., Li, X., Du, J., Yao, W., Sun, G., Dong, X., Liu, Z., Ou, J., Meng, Q., Gu, W., y Wang, W. (2011).** Identification and isolation of a spiroplasma pathogen from diseased freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*, in China: A new freshwater crustacean host. *Aquaculture*, 318(1-2), pp. 1-6.
249. **Liehmann, L., Degasperi, B., Spergser, J., y Niebauer, G. (2006).** *Mycoplasma felis* arthritis in two cats. *J Small Anim Pract*, 47(8), pp. 476-479.
250. **Lierz, M., Schmidt, R., Brunberg, L., y Runge, M. (2000).** Isolation of *Mycoplasma meleagridis* from free-ranging birds of prey in Germany. *J Vet Med*, 47(1), pp. 63-67.
251. **Lindstedt, B. (2005).** Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis*, 26(13), pp. 2567-2582.
252. **Lo, S. (1986).** Isolation and identification of a novel virus from patients with AIDS. *Am J Trop Med Hyg*, 35 (4), pp. 675-676.
253. **Lobo, E., Vega, A., y Hernández, Y. (2006).** Desarrollo de un sistema de diagnóstico para la detección de micoplasmas en cultivos celulares, sueros y productos biofarmacéuticos. *Rev Salud Anim*, 28(1), pp. 21-30.
254. **Löffert, D. (2013).** Standardized Solutions for Quantitative and Real-Time RT-PCR to Accelerate Biopharmaceutical Development. In J. Knäblein (Ed.), *Modern Biopharmaceuticals: Recent Success Stories* (pp. 95-111). Weinheim: Wiley-Blackwell.
255. **Loughney, K., Lund, E., y Dahlberg, J. E. (1982).** tRNA genes are found between 16S and 23S rRNA genes in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res*, 10(5), pp. 1607-1624.
256. **Ludwig, W., Schleifer, K., y Whitman, W. (2009).** Revised road map to the phylum Firmicutes. In P. Vos, G. Garrity, D. Jones, N. Krieg, W. Ludwig, F. Rainey, K.H. Schelifer y W. Whitman (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. III, pp. 1-13). New York: Springer.

257. Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadukumar, A., Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Förster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A.W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lüssmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A., y Schleifer, K. H. (2004). ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res*, 32(4), pp. 1363-1371.
258. Ludwig, W., y Schleifer, K. (2005). Molecular phylogeny of bacteria based on comparative sequence analysis of conserved genes. In J. Sapp (Ed.), *Microbial Phylogeny and Evolution, Concepts and Controversies* (pp. 70-98). Oxford: Oxford University Press.
259. Luttrell, M., Stallknecht, D., Kleven, S., Kavanaugh, D., Corn, J., y Fischer, J. (2001). *Mycoplasma gallisepticum* in house finches (*Carpodacus mexicanus*) and other wild birds associated with poultry production facilities. *Avian Dis*, 45(2), pp. 321-329.
260. Lynch, M., Taylor, T., Duigman, P., Swingler, J., Marenda, M., Arnould, J., y Kirkwood, R. (2011). Mycoplasmas in Australian fur seals (*Arctocephalus pusillus doriferus*): identification and association with abortion. *J Vet Diagn Invest*, 23(6), pp. 1123-1130.
261. Maes, D., Segales, J., Meyns, T., Sibila, M., Pieters, M., y Haesebrouck, F. (2008). Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Vet Microbiol*, 126(4), pp. 297-309.
262. Maiden, M., Bygraves, J., Feil, E., Morelli, G., Russell, J., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M., y Spratt, B. (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(6), pp. 3140-3145.
263. Manhart, L., Dutro, S., Holmes, K., Stevens, C., Critchlow, C., Eschenbach, D., y Totten, P. (2001). *Mycoplasma genitalium* is associated with mucopurulent cervicitis. *Int J STD AIDS*, 12(2), p. 69.
264. Manso-Silván, L., Vilei, E., Sachse, K., Djordjevic, S., Thiaucourt, F., y Frey, J. (2009). *Mycoplasma leachii* sp. nov. as a new species designation for *Mycoplasma* sp. bovine group 7 of Leach, and reclassification of *Mycoplasma*

- mycoides* subsp. *mycoides* LC as a serovar of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 59(6), pp. 1353-1358.
265. **Marshall, A., Miles, R., y Richards, L. (1995).** The phagocytosis of Mycoplasmas. *J Med Microbiol*, 43(4), pp. 239-250.
266. **Martínez-Díaz, V. L., Silvestre-Ferreira, A. C., Vilhena, H., Pastor, J., Francino, O., y Altet, L. (2013).** Prevalence and co-infection of haemotropic mycoplasmas in Portuguese cats by real-time polymerase chain reaction. *J Feline Med Surg*, 15(10), pp. 879-885.
267. **Martoja, R., Martoja-Pierson, M., y Grumbles, L. C. (1970).** *Técnicas de histología animal*. Barcelona: Toray-Masson.
268. **Masover, G., Razin, S., y Hayflick, L. (1977).** Effects of carbon dioxide, urea, and ammonia on growth of *Ureaplasma urealyticum* (T-strain *Mycoplasma*). *J Bacteriol*, 130(1), pp. 292-296.
269. **Mayor, D., Jores, J., Korczak, B., y Kuhnert, P. (2008).** Multilocus sequence typing (MLST) of *Mycoplasma hyopneumoniae*: a diverse pathogen with limited clonality. *Vet Microbiol*, 127(1-2), pp. 63-72.
270. **Mayor, D., Zeeh, F., Frey, J., y Kuhnert, P. (2007).** Diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig farms revealed by direct molecular typing of clinical material. *Vet Res*, 38(3), pp. 391-398.
271. **McAuliffe, L., Ellis, R., Ayling, R., y Nicholas, R. (2003).** Differentiation of *Mycoplasma* Species by 16S Ribosomal DNA PCR and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Fingerprinting. *J Clin Microbiol*, 41, pp. 4844-4847.
272. **McAuliffe, L., Ellis, R., Lawes, J., y Ayling, R. (2005).** 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis; a single generic test for detecting and differentiating *Mycoplasma* species. *J Med Microbiol*, 54, pp. 731-739.
273. **McAuliffe, L., Gosney, F., Hlusek, M., de Garnica, M., Spergser, J., Kargl, M., Rosengarten, R., Ayling, R.D., Nicholas, R.A., y Ellis, R. (2011).** Multilocus sequence typing of *Mycoplasma agalactiae*. *J Med Microbiol*, 60(6), pp. 803-811.

Referencias bibliográficas

274. **Mc Bride, M. (2001)**. Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement over surfaces. *Annu Rev Microbiol*, 55, pp. 49-75.
275. **Mc Intosh, D., Ji, B., Forward, B., Puvanendran, V., Boyce, D., y Ritchie, R. (2008)**. Culture-independent characterization of the bacterial populations associated with cod (*Gadus morhua* L.) and live feed at an experimental hatchery facility using denaturing gradient gel electrophoresis. *Aquaculture*, 275, pp. 42-50.
276. **Mc Laughlin, R., Chen, M., Zheng, Q., Zhao, Q., y Wang, D. (2012)**. Analysis of the bacterial diversity in the fecal material of the endangered Yangtze finless porpoise, *Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis*. *Mol Biol Rep*, 39(5), pp. 5669-5676.
277. **Mc Martin, D., MacOwan, K., y Swift, L. (1980)**. A century of classical contagious caprine pleuropneumonia: from original description to aetiology. *Br Vet J*, 136(5), pp. 507-515.
278. **Meseguer, M., Álvarez, A., Rejas, M., Sánchez, C., Pérez-Díaz, J., y Baquero, F. (2003)**. *Mycoplasma pneumoniae*: a reduced-genome intracellular bacterial pathogen. *Infect Genet Evol*, 3(1), pp. 47-55.
279. **Meziti, A., Mente, E., y Kormas, K. (2012)**. Gut bacteria associated with different diets in reared *Nephrops norvegicus*. *Syst Appl Microbiol*, 35(7), pp. 473-482.
280. **Miles, K., Mc Auliffe, L., Persson, A., Ayling, R., y Nicholas, R. (2005)**. Insertion sequence profiling of UK *Mycoplasma bovis* field isolates. *Vet Microbiol*, 107(3-4), pp. 301-306.
281. **Miles, R. (1992)**. Catabolism in mollicutes. *J Gen Microbiol*, 138(9), pp. 1773-1783.
282. **Miles, R., y Agbanyim, C. (1998)**. Determination of substrate utilization rates by Mycoplasmas. In R. Miles, y R. Nicholas (Eds.), *Methods in Molecular Biology: Mycoplasma Protocols* (Vol. 104, pp. 95-103). Totowa: Humana Press.

283. **Miles, R., y Lee, D. (1983).** Carbohydrate utilisation by *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* strain T1 in a medium without serum. *Microbios Lett*, 24, pp. 129-133.
284. **Minion, F., y Rosenbusch, R. (1993).** Extramembranous structure in *Mycoplasmas*. *Subcell Biochem*, 20, pp. 189-201.
285. **Miyata, M. (2008).** Centipede and inchworm models to explain *Mycoplasma* gliding. *Trends Microbiol*, 16(1), pp. 6-12.
286. **Miyata, M. (2010).** Unique centipede mechanism of *Mycoplasma* gliding. *Annu Rev Microbiol*, 64, pp. 519-537.
287. **Miyata, M., y Uenoyama, A. (2002).** Movement on the cell surface of the gliding bacterium, *Mycoplasma mobile*, is limited to its head-like structure. *FEMS Microbiol Lett*, 215(2), pp. 285-289.
288. **Miyata, M., Ryu, W., y Berg, H. (2002).** Force and velocity of *Mycoplasma mobile* gliding. *J Bacteriol*, 184, pp. 1827-1831.
289. **Miyata, M., Yamamoto, H., Shimizu, T., Uenoyama, A., Citti, C., y Rosengarten, R. (2000).** Gliding mutants of *Mycoplasma mobile*: relationships between motility and cell morphology, cell adhesion and microcolony formation. *Microbiology*, 146, pp. 1311-1320.
290. **Moalic, P., Kempf, I., Gesbert, F., y Laigret, F. (1997).** Identification of two pathogenic avian *Mycoplasmas* as strains of *Mycoplasma pullorum*. *Int J Syst Bacteriol*, 47(1), pp. 171-174.
291. **Mohammed, H., Carpenter, T., y Yamamoto, R. (1987).** Economic impact of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* in commercial layer flocks. *Avian Dis*, 31(3), pp. 477-482.
292. **Molla Kazemiha, V., Shokrgozar, M.A., Arabestani, M.R., Shojaei Moghadam, M., Azar, i S., Maleki, S., Amanzadeh, A., Jeddi Tehrani, M., y Shokri, F. (2009).** PCR-based detection and eradication of mycoplasmal infections from various mammalian cell lines: a local experience. *Cytotechnology*, 61(3), pp. 117-124.

Referencias bibliográficas

293. **Moran, D., Turner, S., y Clements, K. (2005).** Ontogenetic Development of the Gastrointestinal Microbiota in the Marine Herbivorous Fish *Kyphosus sydneyanus*. *Microbial Ecology*, 49, pp. 590-597.
294. **Morgan, E. A., Ikemura, T., Lindahl, L., Fallon, A. M., y Nomura, M. (1978).** Some rRNA operons in *E. coli* have tRNA genes at their distal ends. *Cell*, 13(2), pp. 332-344.
295. **Morgan, K., y Tromborg, C. (2007).** Sources of stress in captivity. *Appl Anim Behav Sci*, 102, pp. 262-302.
296. **Moulder, R. W., French, F. E., y Chang, C. (2002).** Simplified media for spiroplasmas associated with tabanid flies. *Can J Microbiol*, 48(1), pp. 1-6.
297. **Mueller, U., y Wolfenbarger, L. (1999).** AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol Evol*, 14(10), pp. 389-394.
298. **Muyzer, G., De Waal, E., y Uitterlinden, A. (1993).** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 59(3), pp. 695-700.
299. **Nagai, R., y Miyata, M. (2006).** Gliding motility of *Mycoplasma mobile* can occur by repeated binding to N-acetylneuraminyllactose (sialyllactose) fixed on solid surfaces. *J Bacteriol*, 188(18), pp. 6469-6475.
300. **Nakane, D., y Miyata, M. (2007).** Cytoskeletal "jellyfish" structure of *Mycoplasma mobile*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(49), pp. 19518-19523.
301. **Nakagawa, T., Uemori, T., Asada, K., Kato, I., y Harasawa, R. (1992).** *Acholeplasma laidlawii* has tRNA genes in the 16S-23S spacer of the rRNA operon. *J Bacteriol*, 174(24), pp. 8163-8165.
302. **Neimark, H., Johansson, K., Rikihisa, Y., y Tully, J. (2001).** Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of '*Candidatus Mycoplasma haemofelis*', '*Candidatus Mycoplasma haemomuris*', '*Candidatus Mycoplasma haemosuis*'. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51, pp. 891-899.

303. Neulinger, S., Gärtner, A., Järnegren, J., Ludvigsen, M., Lochte, K., y Dullo, W. (2009). Tissue-Associated "Candidatus Mycoplasma corallicola" and Filamentous Bacteria on the Cold-Water Coral *Lophelia pertusa*. *Appl Environ Microbiol*, 75(5), pp. 1437-1444.
304. Neulinger, S., Järnegren, J., Ludvigsen, M., Lochte, K., y Dullo, W. (2008). Phenotype-specific bacterial communities in the cold-water coral *Lophelia pertusa* (Scleractinia) and their implications for the coral's nutrition, health, and distribution. *Appl Environ Microbiol*, 74(23), pp. 7272-7285.
305. Nicholas, R., y Ayling, R. (2003). *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. *Res Vet Sci*, 74(2), pp. 105-112.
306. Nicholas, R., y Churchward, C. (2012). Contagious caprine pleuropneumonia: new aspects of an old disease. *Transbound Emerg Dis*, 59(3), pp. 189-196.
307. Nicholas, R., Ayling, R., y Mc Auliffe, L. (2008). *Mycoplasma disease of ruminants*. Wallingford: C.A.B. international.
308. Nicolet, J. (1996). Animal Mycoplasmoses: a general introduction. *Review Sel. Tech. Off. Int. Epiz.*, 15, pp. 1233-1240.
309. Nonaka, T., Adan-Kubo, J., y Miyata, M. (2010). Triskelion structure of the Gli521 protein, involved in the gliding mechanism of *Mycoplasma mobile*. *J Bacteriol*, 192(3), pp. 636-642.
310. Nunan, L., Lightner, D., Oduori, M., y Gasparich, G. (2005). *Spiroplasma penaei* sp. nov., associated with mortalities in *Penaeus vannamei*, Pacific white shrimp. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55(6), pp. 2317-2322.
311. Nunan, L., Pantoja, C., Salazar, M., Aranguren, F., y Lightner, D. (2004). Characterization and molecular methods for detection of a novel spiroplasma pathogenic to *Penaeus vannamei*. *Dis Aquatic Org*, 62, pp. 255-264.
312. Nylund, A., Ottem, K., Watanabe, K., Karlsbakk, E., y Krossøy, B. (2006). Francisella sp. (Family Francisellaceae) causing mortality in Norwegian cod (*Gadus morhua*) farming. *Arch Microbiol*, 185(5), pp. 383-392.

Referencias bibliográficas

313. **Ogawa, Y., Ooka, T., Shi, F., Ogura, Y., Nakayama, K., Hayashi, T., y Shimoji, Y. (2011).** The Genome of *Erysipelothrix rhusiopathiae*, the Causative Agent of Swine Erysipelas, Reveals New Insights into the Evolution of Firmicutes and the Organism's Intracellular Adaptations. *J Bacteriol*, 193(12), pp. 2959-2971.
314. **Ohtani, N., y Miyata, M. (2007).** Identification of a novel nucleoside triphosphatase from *Mycoplasma mobile*: a prime candidate motor for gliding motility. *Biochem J*, 403(1), pp. 71-77.
315. **Opel, K. L., Chung, D., y McCord, B. R. (2010).** A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *J Forensic Sci*, 55(1), pp. 25-33.
316. **Ortega Martín, C., Vicente Rubiano, M., y Sanz Tolón, A. (2009).** Estudio de las causas de varamiento y muerte de dos cetáceos en las Islas Canarias. *RCCV*, 3(2), pp. 284-292.
317. **Oshima, K., Maejima, K., y Namba, S. (2013).** Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas. *Front Microbiol*, 4(230), pp. 1-8.
318. **Osorio, C. R., Collins, M. D., Romalde, J. L., y Toranzo, A. E. (2005).** Variation in 16S-23S rRNA intergenic spacer regions in *Photobacterium damsela*: a mosaic-like structure. *Appl Environ Microbiol*, 71(2), pp. 636-645.
319. **Paillard, C., Le Roux, F., y Borrego, J. (2004).** Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. *Aquat Living Resour*, 17, pp. 477-498.
320. **Pedraza-Díaz, S., Rengifo-Herrera, C., García-Párraga, D., García-Peña, F., García-Moreno, F., Castro-Urda, J., Pereira-Bueno, J., Ferre, I., San Miguel, E., Sánchez-Sánchez, A., Belda-Ávila, M., Gómez-Bautista, M., y Ortega-Mora, L. (2011).** Estado sanitario de pinnípedos en Península Antártica: impacto humano. 7-9 de Septiembre, p. 96. Palma de Mallorca (España): VIII Simposio Estudios Polares.
321. **Penn, K., Wu, D., Eisen, J.A., y Ward, N. (2006).** Characterization of bacterial communities associated with deep-sea corals on Gulf of Alaska seamounts. *Appl Environ Microbiol*, 72(2), pp. 1680-1683.

322. Penner, G., Bush, A., Wise, R., Kim, W., Domier, L., Kasha, K., Laroche, A., Scoles, G., Molnar, S.J., y Fedak, G. (1993). Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PCR Methods Appl*, 2(4), pp. 341-345.
323. Peters, I., Helps, C., Mc Auliffe, L., Neimark, H., Lappin, M., Gruffydd-Jones, T., Day, M.J., Hoelzle, L.E., Willi, B., Meli, M., Hofmann-Lehmann, R., y Tasker, S. (2008). RNaseP RNA Gene (rnpB) Phylogeny of Haemoplasmas and Other *Mycoplasma* Species. *J Clin Microbiol*, 46, pp. 1873-1877.
324. Pettersson, B., Tully, J., Bölske, G., y Johansson, K. (2000). Updated phylogenetic description of the *Mycoplasma hominis* cluster (Weisburg et al. 1989) based on 16S rDNA sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*, 50(1), pp. 291-301.
325. Pfützner, H., y Sachse, K. (1996). *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle. *Rev Sci Tech*, 15(4), pp. 1477-1494.
326. Pierce, G. J., Allcock, L., Bruno, I., Bustamante, P., González, A., Guerra, A., Jereb, P., Lefkaditou, E., Malham, S., Moreno, A., Pereira, J., Piatkowski, U., Rasero, M., Sánchez, P., Santos, M.B., Santurtún, M., Seixas, S., Sobrino, I., y Villanueva, R. (2010). Cephalopod biology and fisheries in Europe. *ICES Cooperative Research Report No. 303*, pp. 18-25.
327. Pilo, P., Fleury, B., Marena, M., Frey, J., y Vilei, E. (2003). Prevalence and distribution of the insertion element ISMag1 in *Mycoplasma agalactiae*. *Vet Microbiol*, 92(1-2), pp. 37-48.
328. Piper, B., Rosengarten, R., y Kirchoff, H. (1987). The influence of various substances on the gliding motility of *Mycoplasma mobile* 163K. *J Gen Microbiol*, 133(11), pp. 3193-3198.
329. Poveda, C. (2012). *Análisis de la región intergénica 16S-23S y del gen ARNr 23S en cepas de campo de Mycoplasma hyopneumoniae. Estudio filogenético de los Mycoplasmas porcinos en base al gen ARNr 23S (Tesis de Doctorado)*. Las Palmas de Gran Canaria, España: Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
330. Poveda, C., Ramírez-Corbera, A. S., Assunção, P., Rosales, R. S., Suárez-Pérez, A., Mederos-Iriarte, L., Vega-Orellana, O.M., de la Fé, C., y Poveda, J.

Referencias bibliográficas

- B. (2012).** Analysis of the 23S rRNA Gene Nucleotide Sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* Field Strains. In C. Citti (Ed.), *Book of Abstracts: 19th Congress of the International Organisation for Mycoplasmaology*, (p. 123). Toulouse, Francia.
331. **Poveda, C., Tomaselli, M., Fernández, A., Ramírez, A. S., Suárez-Pérez, A., Rosales, R., y Antunes, N. (2009).** Isolation of Mycoplasmas from odontocetes cetacean in Canary Islands. *Congress Programme and Abstracts. 10-12 junio*, p. 59. Maspalomas (Las Palmas, España): A review of developments over the last decade.
332. **Poveda, J. (1988).** *Estudio epizootológico de infecciones por microorganismos del género Mycoplasma en aves (Tesis de Doctorado)*. Córdoba, España: Universidad de Córdoba.
333. **Poveda, J. (1998).** Biochemical characteristics in *Mycoplasma* identification. In R. Miles, y R. Nicholas (Eds.), *Methods in Molecular Biology: Mycoplasma Protocols* (Vol. 104, pp. 69-78). Totowa: Human Press.
334. **Poveda, J., y Nicholas, R. (1998).** Serological identification of *Mycoplasmas* by growth and metabolic inhibition tests. (R. Miles, y R. Nicholas, Eds.) *Methods in Molecular Biology: Mycoplasma Protocols*, 104, pp. 105-111.
335. **Poveda, J., Carranza, J., Miranda, A., Garrido, A., Hermoso, M., Fernández, A., y Domenech, J. (1990).** An epizootiological study of avian Mycoplasmas in southern Spain. *Avian Pathol*, 19(4), pp. 627-633.
336. **Poveda, J., Ramírez, A. S., De la Fe, C., Assunção, P., y Díaz-Beltrana, L. (2002).** Mycoplasmas. In S. Vadillo, S. Píriz, y E. Mateos (Eds.), *Manual de Microbiología* (pp. 423-430). Madrid: McGraw-Hill.
337. **Powers, J., y Johnson, M. (2012).** Mycoplasmal panencephalitis: a neuropathologic documentation. *Acta Neuropathol*, 124(1), pp. 143-148.
338. **Prescott, L., Harley, J., y Klein, D. (2004).** *Microbiología*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España.
339. **Puerta, J., Usme-Ciro, J., y Gallego, J. C. (2013).** Implementación de un control interno en la detección molecular de las principales especies de

- micoplasmas contaminantes de cultivos celulares. *Rev Cient Salud Uninorte*, 29(2), pp. 160-173.
340. **Pulsford, A., Lemaire-Gony, S., y Farley, S. (1994).** Effects of stress on the immune system of fish. In D. Sutcliffe (Ed.), *Water Quality and Stress Indicators in Marine and Freshwater Ecosystems: Linking levels of organisation (individuals, populations, communities)* (pp. 111-123). Ambleside: Freshwater Biological Association.
341. **Ramírez, A. S. (1999).** *Desarrollo de dos medios de cultivo para la replicación de microorganismos de la clase Mollicutes (Tesis de Doctorado)*. Las Palmas de Gran Canaria, España: Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
342. **Ramírez, A. S., Naylor, C. J., Hammond, P. P., y Bradbury, J. M. (2006).** Development and evaluation of a diagnostic PCR for *Mycoplasma synoviae* using primers located in the intergenic spacer region and the 23S rRNA gene. *Vet Microbiol*, 118(1-2), pp. 76-82.
343. **Ramírez, A. S., Dare, C., Yavari, C., y Bradbury, J. (2012).** A diagnostic polymerase chain reaction for *Mycoplasma iowae* using primers located in the intergenic spacer region and the 23S rRNA gene. *Avian Pathol*, 41(3), pp. 317-322.
344. **Ramírez, A. S., González, M., Déniz, S., Fernández, A., y Poveda, J. (1997).** Evaluation of a modified SP-4 in the replication of *Mycoplasma* spp. In J. Frey, y K. Sarris (Eds.), *Mycoplasmas of Ruminants: Pathogenicity, Diagnostics, Epidemiology and Molecular Genetics* (Vol. II, pp. 36-39). Luxembourg: European Cooperation on Scientific and Technical Research.
345. **Ramírez, A. S., Naylor, C., Pitcher, D., y Bradbury, J. (2008A).** High inter-species and low intra-species variation in 16S-23S r DNA spacer sequences of pathogenic avian *Mycoplasmas* offers potential use as a diagnostic tool. *Vet Microbiol*, 128, pp. 279-287.
346. **Ramírez, A. S., Naylor, C., Yavari, C., Dare, C., y Bradbury, J. (2011).** Analysis of the 16S to 23S rRNA intergenic spacer region of *Mycoplasma synoviae* field strains. *Avian Pathology*, 40(1), pp. 79-86.

Referencias bibliográficas

347. **Ramírez, A. S., Rosas, A., Hernández-Beriain, J., Orengo, J., Saavedra, P., de la Fe, C., Fernández, A., y Poveda, J. (2005).** Relationship between rheumatoid arthritis and *Mycoplasma pneumoniae*: a case-control study. *Rheumatology (Oxford)*, *44*(7), pp. 912-914.
348. **Ramírez, A. S., Sachse, K., Hotzel, H., y Bradbury, J. (2008B).** Analysis of the 23S rDNA of avian *Mycoplasmas*. In F. Guo, y C. Bébéar (Ed.), *Abstracts book: 17th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology*, (p. 129). Tianjin, Peoples Republic of China.
349. **Ramírez, A. S., Yavari, C., Dare, C., y Bradbury, J. (2010).** Indirect evidence for the position of the 5S rRNA gene with respect to the 23S rRNA gene in avian *Mycoplasmas*. In D. Brown, y A. Bertaccini (Ed.), *Program and Abstracts: 18th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology*, (p. 184). Chianciano Terme, Siena, Italia.
350. **Razin, S. (1983).** Urea hydrolisis. In S. Razin, y J. Tully (Eds.), *Methods in Mycoplasmaology* (Vol. I). New York: Academic Press.
351. **Razin, S. (1991).** The genera *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, and *Asteroleplasma*. In A. Balows, H. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, y K. Schleifer (Eds.), *The Prokaryotes* (Vol. II, pp. 1937-1959). New York: Springer-Verlag.
352. **Razin, S. (1992).** *Mycoplasma*, taxonomy, and ecology. In J. Maniloff, R. Mcelhaney, L. Finch, y J. Baseman (Eds.), *Mycoplasmas. Molecular Biology and Pathogenesis* (pp. 3-22). Washington, DC: American Society for Microbiology.
353. **Razin, S. (1995).** Molecular properties of mollicutes: a synopsis. In S. Razin, y J. Tully (Eds.), *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology: Molecular Characterization* (Vol. 1, pp. 1-25). Academic Press.
354. **Razin, S., y Cirillo, V. (1983).** Sugar Fermentation. In S. Razin, y J. Tully (Eds.), *Methods in Mycoplasmaology* (Vol. I). New York: Academic Press.
355. **Razin, S., y Freundt, E. (1984).** The *Mycoplasmas*. In N. Krieg (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. I, pp. 740-793). Baltimore: Williams y Wilkins.

356. **Razin, S., y Tully, J. G. (1996).** *Molecular and Diagnostic procedures un Mycoplasmaology*. San Diego: Academic Press.
357. **Razin, S., Yogev, D., y Naot, Y. (1998).** Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(4), pp. 1094-1156.
358. **Rebelo, A., Parker, L., y Cai, H. (2011).** Use of high-resolution melting curve analysis to identify Mycoplasma species commonly isolated from ruminant, avian, and canine samples. *J Vet Diagn Invest*, 23, pp. 932-936.
359. **Relancio, B. (2010).** *Puesta a punto de técnicas de PCR para la detección de mycoplasmas presentes en lesiones neumónicas de corderos de matadero (Trabajo de fin de Máster)*. Zaragoza, España: Universidad de Zaragoza.
360. **Rengifo-Herrera, M. C. (2013).** *Presence of parasites in pinnipeds from the Antarctic (Tesis de doctorado)*. Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid.
361. **Rivera-Tapia, J. (2004).** Detección de micoplasmas en biopsias intestinales. *Gac Méd Méx*, 140(6), pp. 655-656.
362. **Robb, I. (1984).** Stereo-biochemistry and functions of polymers in microbial adhesion and aggregation. In K. Marshall (Ed.), *Microbial Adhesion and Aggregation* (pp. 39-49). Berlin: Springer-Verlag.
363. **Roberts, R. (2005).** How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(5), pp. 5905-5908.
364. **Robertson, J., y Smook, E. (1976).** Cytochemical evidence of extramembranous carbohydrates on *Ureaplasma urealyticum* (T-strain *Mycoplasma*). *J Bacteriol*, 128(2), pp. 658-660.
365. **Robertson, J., y Taylor-Robinson, D. (2010).** Genus II. *Ureaplasma* Shepard, Lunceford, Ford, Purcell, Taylor-Robinson, Razin and Black 1974, 167AL. In N. Krieg, J. Staley, D. Brown, B. Hedlund, B. Paster, N. Ward, W. Ludwig, y W. Whitman (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. IV, pp. 613-639). New York: Springer.

Referencias bibliográficas

366. **Rodicio, M., y Mendoza, M. (2004).** Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: Principles, methods and applications in clinical microbiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 22, pp. 238-245.
367. **Rodríguez, J., Gutiérrez, C., Brooks, D., Damassa, A., Orós, J., y Fernández, A. (1998).** A Pathological and Immunohistochemical Study of Goat Kids Undergoing Septicaemic Disease Caused by *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (Large Colony Type). *J Vet Med B*, 45, pp. 141–149.
368. **Roediger, W. E. (2004).** Intestinal *Mycoplasma* in Crohn's disease. *Novartis Found Symp*, 263, pp. 85-93.
369. **Romalde, J., y Barja, J. (2010).** Bacteria in molluscs: good and bad guys. In A. Méndez-Vilas (Ed.), *Microbiology Book Series Number 2: Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* (Vol. 1, pp. 136-147). Badajoz, España: Formatex Research Center.
370. **Román, L., Real, F., Sorroza, L., Padilla, D., Acosta, B., Grasso, V., Bravo, J., y Acosta, F. (2012).** The in vitro effect of probiotic *Vagococcus fluvialis* on the innate immune parameters of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Fish Shellfish Immunol*, 33(5), pp. 1071-1075.
371. **Rosales, R. (2014).** *Desarrollo de herramientas de tipificación y diagnóstico aplicadas al estudio de Mycoplasma hyorhinis y evaluación de un modelo experimental de neumonía de lechones (Tesis de Doctorado)*. Las Palmas de Gran Canaria, España: Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
372. **Rosenbusch, R., y Minion, F. (1992).** Cell envelope: Morphology and Biochemistry. In J. Maniloff, R. McElhaney, L. Finch, y J. Baseman (Eds.), *Mycoplasma: Molecular Biology and Pathogenesis* (pp. 73-77). Washington DC: American Society for Microbiology.
373. **Rosendal, S. (1988).** *Mycoplasma*. In C. Gyles, y C. Thoen (Eds.), *Pathogenesis of bacterial infections on animals* (Vol. 10, pp. 205-215). Ames: Iowa State University Press.

374. **Rosendal, S., y Black, F. (1972).** Direct and indirect immunofluorescence of unfixed and fixed Mycoplasma colonies. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol*, 80(4), pp. 615-622.
375. **Rosendal, S., y Vinther, O. (1977).** Experimental Mycoplasmal pneumonia in dogs: electron microscopy of infected tissue. *Acta Pathol Microbiol Scand B*, 85B(6), pp. 462-465.
376. **Rosengarten, R., Klein-Struckmeier, A., y Kirchhoff, H. (1988).** Rheotactic behavior of a gliding Mycoplasma. *J Bacteriol*, 170(2), pp. 989-990.
377. **Ross, R., y Whittlestone, P. (1983).** Recovery of, identification of, and serological response to porcine *Mycoplasmas*. In J. Tully, y S. Razin (Eds.), *Methods in Mycoplasmaology* (Vol. II, pp. 115-127). New York: Academic Press.
378. **Roselló-Mora, R. (2003).** Opinion: the species problem, can we achieve a universal concept? *Syst Appl Microbiol*, 26(3), pp. 323-326.
379. **Roselló-Mora, R., y Amann, R. (2001).** The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev*, 25(1), pp. 39-67.
380. **Rottem, S., y Kahane, I. (Eds.). (1993).** *Subcellular Biochemistry. Mycoplasma Cell Membranes* (Vol. 20). New York: Plenum Press.
381. **Ruhnke, H., y Madoff, S. (1992).** *Mycoplasma phocidae* sp. nov., Isolated from Harbor Seals (*Phoca vitulina* L.). *Int J Syst Bacteriol*, 42(2), pp. 211-214.
382. **Rurangirwa, F., McGuire, T., Magnuson, N., Kibor, A., y Chema, S. (1987).** Composition of a polysaccharide from *Mycoplasma* (F-38) recognised by antibodies from goats with contagious pleuropneumonia. *Res Vet Sci Mar*, 42(2), pp. 175-178.
383. **Schalock, P., Dinulos, J., Pace, N., Schwarzenberger, K., y Wenger, J. (2006).** Erythema multiforme due to *Mycoplasma pneumoniae* infection in two children. *Pediatr Dermatol*, 23(6), pp. 546-555.
384. **Schena, M., Shalon, D., Heller, R., Chai, A., Brown, P., y Davis, R. (1996).** Parallel human genome analysis: Microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, pp. 10614-10619.

Referencias bibliográficas

385. **Schimke, R., y Barile, M. (1963).** Arginine metabolism in pleuropneumonia-like organisms isolated from mammalian cell culture. *J Bacteriol*, 86, pp. 195-206.
386. **Schimke, R., Berlin, C., Sweeney, E., y Carroll, W. (1966).** The Generation of Energy by the Arginine Dihydrolase Pathway in *Mycoplasma hominis* 07. *J Biol Chem*, 241, pp. 2228-2236 .
387. **Schnee, C., Schulsse, S., Hotzel, H., Ayling, R., Nicholas, R., Schubert, E., Heller, M., Ehricht, R., y Sachse, K. (2012).** A novel rapid DNA microarray assay enables identification of 37 Mycoplasma Species and highlights multiple Mycoplasma infections. *PLoS One*, 7(3), p. e33237.
388. **Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., y Johne, R. (2012).** PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol*, 113(5), pp. 1014-1026.
389. **Senterfit, L. (1983).** Tetrazolium reduction. In S. Razin, y J. Tully (Eds.), *Methods on Mycoplasmaology* (Vol. I, pp. 377-378). New York: Academic Press.
390. **Seto, S., Uenoyama, A., y Miyata, M. (2005).** Identification of a 521-kilodalton protein (Gli521) involved in force generation or force transmission for *Mycoplasma mobile* gliding. *J Bacteriol*, 187(10), pp. 3502-3510.
391. **Shepard, M., y Howard, D. (1970).** Identification of "T" *Mycoplasmas* in primary agar cultures by means of a direct test for urease. *Ann N Y Acad Sci*, 174(2), pp. 809-819.
392. **Shimizu, T., y Miyata, M. (2002).** Electron microscopic studies of three gliding Mycoplasmas, *Mycoplasma mobile*, *M. pneumoniae*, and *M. gallisepticum*, by using the freeze-substitution technique. *Curr Microbiol*, 44(6), pp. 431-434.
393. **Smith, P. (1955).** Amino acid metabolism by pleuropneumonia like organisms. I. General catabolism. *J Bacteriol*, 70(5), pp. 552-556.
394. **Spergser, J., Aurich, C., Aurich, J., y Rosengarten, R. (2002).** High prevalence of Mycoplasmas in the genital tract of asymptomatic stallions in Austria. 87(2), pp. 119-129.
395. **Ståby, M. (2004).** Seal finger-a problem among hunters once again. *Lakartidningen*, 101, pp. 190-1911.

396. **Stackebrandt, E., y Goebel, B. (1994)**. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol*, 44(4), pp. 846-849.
397. **Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G., Grimont, P., Kampfer, P., y Maiden, M. (2002)**. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52, pp. 1043-1047.
398. **Stadtländer, C., y Kirchhoff, H. (1990)**. Surface parasitism of the fish *Mycoplasma Mycoplasma mobile* 163 K on tracheal epithelial cells. *Vet Microbiol*, 21(4), pp. 339-343.
399. **Stadtländer, C., y Kirchhoff, H. (1995)**. Attachment of *Mycoplasma mobile* 163 K to piscine gill arches and rakers--light, scanning and transmission electron microscopic findings. *Br Vet J*, 151(1), pp. 89-100.
400. **Stadtländer, C., Lotz, W., Körting, W., y Kirchhoff, H. (1995)**. Piscine gill epithelial cell necrosis due to *Mycoplasma mobile* strain 163 K: comparison of in-vivo and in-vitro infection. *J Comp Pathol*, 112(4), pp. 351-359.
401. **Stanley, S. O., y Morita, R. Y. (1968)**. Salinity effect on the maximal growth temperature of some bacteria isolated from marine environments. *J Bacteriol*, 95(1), pp. 169-173.
402. **Stern, D. L. (2013)**. The genetic causes of convergent evolution. *Nat Rev Genet*, 14(11), pp. 751-764.
403. **Stipkovits, L., y Kempf, I. (1996)**. Mycoplasmoses in poultry. *OIE Revue Scientifique et Technique*, 15(4), pp. 1495-1525.
404. **Stirling, D. (2003)**. Qualitative and Quantitative PCR - A Technical Overview. In J. Bartlett, y D. Stirling (Eds.), *Methods in Molecular Biology: PCR protocols* (Vol. 226, pp. 181-184). Totowa, NJ, USA: Humana Press Inc.
405. **Suárez-Pérez, A. (2012)**. *Estudio taxonómico polifásico de bacterias del género Mycoplasma en aves silvestres : descripción de una nueva especie, Mycoplasma neophronis (Tesis de Doctorado)*. Las Palmas de Gran Canaria, España: Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Referencias bibliográficas

406. **Suárez-Pérez, A., Ramírez, A., Rosales, R., Calabuig, P., Poveda, C., Rosselló-Móra, R., Nicholas, R.A., y Poveda, J. (2012).** *Mycoplasma neophronis* sp. nov., isolated from the upper respiratory tract of Canarian Egyptian vultures (*Neophron percnopterus majorensis*). *Int J Syst Evol Microbiol*, 62(6), pp. 1321-1325.
407. **Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes (1979).** Proposal of minimal standards for descriptions of new species of the class Mollicutes: International Committee on Systematic Bacteriology. Subcommittee on the Taxonomy of Mollicute. *Int J Syst Bacteriol*, 29, pp. 172-180.
408. **Sukhanova, E. V., Denikina, N. N., Triboy, T., Dzyuba, E. V., y Belkova, N. (2014).** Molecular and Phylogenetic Studies of a Mycoplasma from the Intestine of Siberian Fish. *Bio-Genetics Journal*, pp. 37-41.
409. **Sukhanova, E., Dzyuba, E., Triboy, T., Nikiforova, T., Denikina, N., y Belkova, N. (2011).** Molecular Genetic and Culture Diagnosis of Mycoplasma in Fish Family Thymallidae. *Doklady Biological Sciences*, 440, 287-289.
410. **Sutcliffe, I., y Russell, R. (1995).** Lipoproteins of gram-positive bacteria. *J Bacteriol*, 177(5), pp. 1123-1228.
411. **Svanevik, C., y Lunestad, B. (2011).** Characterisation of the microbiota of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). *Int J Food Microbiol*, 151(2), pp. 164-170.
412. **Sykes, J. (2014).** Mycoplasma Infections. In J. Sykes, *Canine & feline. Infectious diseases* (pp. 382-389). St Louis: Elsevier.
413. **Sykes, J., y Tasker, S. (2014).** Hemoplasma Infections. In J. Sykes, *Canine & feline. Infectious diseases* (pp. 390-398). St Louis: Elsevier.
414. **Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., y Kumar, S. (2011).** MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*, 28(10), pp. 2731-2739.
415. **Tanaka, R., Ootsubo, M., Sawabe, T., Ezura, Y., y Tajima, K. (2004).** Biodiversity and in situ abundance of gut microflora of abalone (*Haliotis discus hannai*) determined by culture-independent techniques. *Aquaculture*, 241, pp. 453-463.

416. **Tang, J., Hu, M., Lee, S., y Roblin, R. (2000).** A polymerase chain reaction based method for detecting *Mycoplasma/Acholeplasma* contaminants in cell culture. *J Microbiol Methods*, 39, pp. 121-126.
417. **Taschke, C., Klinkert, M. Q., Wolters, J., y Herrmann, R. (1986).** Organization of the ribosomal RNA genes in *Mycoplasma hyopneumoniae*: the 5S rRNA gene is separated from the 16S and 23S rRNA genes. *Mol Gen Genet*, 205(3), pp. 428-433.
418. **Taylor-Robinson, D. (1989).** The *Mycoplasmatales*: *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Acholeplasma*, *Spiroplasma*, and *Anaeroplasma*. In A. Balows, H. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, y K. Schleifer (Eds.), *The Prokaryotes* (pp. 664-681). New York: Springer-Verlag.
419. **Taylor-Robinson, D., y Bredt, W. (1983).** Motility of *Mycoplasma* strain G37. *Yale J Biol Med*, 56, p. 910.
420. **Tetlock, A., Yost, C., Stavrinides, J., y Manzon, R. (2012).** Changes in the gut microbiome of the sea lamprey during metamorphosis. *Appl Environ Microbiol*, 78(21), pp. 7638-7644.
421. **Thacker, E. (2001).** Immunology of the porcine respiratory disease complex. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 17(3), pp. 551-565.
422. **Thacker, E. (2006).** Mycoplasmal diseases. In J. Zimmerman, L. Karriker, A. Ramirez, K. Schwartz, y G. Stevenson (Eds.), *Diseases of Swin* (pp. 701-717). New York: Blackwell Publishing.
423. **Thacker, E., Thacker, B., y Janke, B. (2001).** Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and swine influenza virus. *J Clin Microbiol*, 39(7), pp. 2525-2530.
424. **Thompson, C. C., Vieira, N. M., Vicente, A. C., y Thompson, F. L. (2011).** Towards a genome based taxonomy of *Mycoplasmas*. *Infect Genet Evol*, 11(7), pp. 1798-1804.
425. **Thrusfield, M., Ortega, C., de Blas, I., Noordhuizen, J. P., y Frankena, K. (2001).** WIN EPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Vet Rec*, 148(18), pp. 567-572.

Referencias bibliográficas

426. **Tortora, G., Funke, B., y Case, C. (2007).** *Introducción a la microbiología*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
427. **Tourtellote, M., y Jacobs, R. (1960).** Physiological and serologic comparisons of PPLO from various sources. *Ann N Y Acad Sci*, 79, pp. 521-530.
428. **Trachtenberg, S. (1998).** Mollicutes-wall-less bacteria with internal cytoskeletons. *J Struct Biol*, 124(2-3), pp. 244-256.
429. **Trachtenberg, S. (2006).** The cytoskeleton of spiroplasma: a complex linear motor. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 11(3-5), pp. 265-283.
430. **Tryland, M., Nymo, I., Nielsen, O., Nordøy, E., Kovacs, K., Krafft, B., Thoresen, S.I., Åsbakk, K., Osterrieder, K., Roth, S.J., Lydersen, C., Godfroid, J., y Blix, A. (2012).** Serum chemistry and antibodies against pathogens in antarctic fur seals, Weddell seals, crabeater seals, and Ross seals. *J Wildl Dis*, 48(3), pp. 632-645.
431. **Tully, J. (1983).** Test for digitonin sensitivity and sterol requirement. In S. Razin, y J. Tully (Eds.), *Methods in Mycoplasmaology* (Vol. I). New York: Academic Press.
432. **Tully, J. (1985).** Newly discovered mollicutes. In S. Razin, y D. Barile (Eds.), *The Mycoplasmas* (Vol. IV, pp. 1-26). New York: Academic Press.
433. **Tully, J. (1993).** Current status of the mollicute flora of humans. *Clin Infect Dis*, 17(1), pp. S2-9.
434. **Tully, J. G., Whitcomb, R. F., Clark, H. F., y Williamson, D. L. (1977).** Pathogenic Mycoplasmas: cultivation and vertebrate pathogenicity of a new spiroplasma. *Science*, 195(4281), pp. 892-894.
435. **Tully, J., y Whitcomb, R. (1995).** Minimal standards for description of new species of the class Mollicutes. In S. Razin, y J. Tully (Eds.), *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology* (Vol. I: Molecular Characterization, pp. 339-347). San Diego: Academic Press.
436. **Tung, S. K., Teng, L. J., Vaneechoutte, M., Chen, H. M., y Chang, T. C. (2007).** Identification of species of *Abiotrophia*, *Enterococcus*, *Granulicatella* and

- Streptococcus* by sequence analysis of the ribosomal 16S-23S intergenic spacer region. *J Med Microbiol*, 56(4), pp. 504-513.
437. **Tyler, S. D., Strathdee, C. A., Rozee, K. R., y Johnson, W. M. (1995).** Oligonucleotide Primers Designed To Differentiate Pathogenic Pseudomonads on the Basis of the Sequencing of Genes Coding for 16S-23S rRNA Internal Transcribed Spacers. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2(4), pp. 448-453.
438. **Uenoyama, A., y Miyata, M. (2005).** Gliding ghosts of *Mycoplasma mobile*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(36), pp. 12754-12758.
439. **Uenoyama, A., y Miyata, M. (2005).** Identification of a 123-kilodalton protein (Gli123) involved in machinery for gliding motility of *Mycoplasma mobile*. *J Bacteriol*, 187(16), pp. 5578-5584.
440. **Uenoyama, A., Kusumoto, A., y Miyata, M. (2004).** Identification of a 349-kilodalton protein (Gli349) responsible for cytoadherence and glass binding during gliding of *Mycoplasma mobile*. *J Bacteriol*, 186(5), pp. 1537-1545.
441. **Uenoyama, A., Seto, S., Nakane, D., y Miyata, M. (2009).** Regions on Gli349 and Gli521 protein molecules directly involved in movements of *Mycoplasma mobile* gliding machinery, suggested by use of inhibitory antibodies and mutants. *J Bacteriol*, 191(6), pp. 1982-1985.
442. **Uphoff, C., y Drexler, H. (2002).** Comparative PCR analysis for detection of *Mycoplasma* infections in continuous cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 38, pp. 79-85.
443. **Van Belkum, A. (2007).** Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). *FEMS Immunol Med Microbiol*, 49(1), pp. 22-27.
444. **Van der Giessen, J. W., Haring, R. M., y Van der Zeijst, B. A. (1994).** Comparison of the 23S ribosomal RNA genes and the spacer region between the 16S and 23S rRNA genes of the closely related *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium paratuberculosis* and the fast-growing *Mycobacterium phlei*. *Microbiology*, 140(5), pp. 1103-1108.

Referencias bibliográficas

445. **Van Kuppeveld, F., Van der Logt, J., Angulo, A.F., Van Zoest, M., Quint, W., Niesters, H., Galama, J.M., y Melchers, W. (1992).** Genus- and species-specific identification of *Mycoplasmas* by 16S rRNA amplification. *Appl Environ Microbiol*, 58(8), pp. 2606–2615. (Corrección del autor - 59:655, 1993)
446. **Veenhuizen, M. (1998).** Three bacterial pathogens in the porcine respiratory disease complex. *Compend Contin Educ Vet*, 20, pp. 11-21.
447. **Vicca, J., Stakenborg, T., Maes, D., Butaye, P., Peeters, J., de Kruif, A., y Haesebrouck, F. (2003).** Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Vet Microbiol*, 97(3-4), pp. 177-190.
448. **Vilei, E., y Frey, J. (2004).** Differential clustering of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC strains by PCR-REA of the *bgl* locus. *Vet Microbiol*, 100(3-4), pp. 283-288.
449. **Volokhov, D. V., Simonyan, V., Davidson, M. K., y Chizhikov, V. E. (2012A).** RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene and the 16S-23S rRNA intergenic transcribed spacer region (ITS) as complementary molecular markers in addition to the 16S rRNA gene for phylogenetic analysis and identification of the species of the family Mycoplasmaceae. *Mol Phylogenet Evol*, 62(1), pp. 512-528.
450. **Volokhov, D., George, J., Liu, S., Ikonomi, P., Anderson, C., y Chizhikov, V. (2006).** Sequencing of the intergenic 16S-23S rRNA spacer (ITS) region of Mollicutes species and their identification using microarray-based assay and DNA sequencing. *Appl Microbiol Biotechnol*, 71, pp. 680-698.
451. **Volokhov, D., Norris, T., Rios, C., Davidson, M., Messick, J., Gulland, F., y Chizhikov, V. (2011).** Novel hemotrophic *Mycoplasma* identified in naturally infected California sea lions (*Zalophus californianus*). *Vet Microbiol*, 149, pp. 262–268.
452. **Volokhov, D., Norris, T., Rios, C., Gulland, F., Davidson, M., y Chizhikov, V. (2010).** *Mycoplasma* flora detected in California Sea Lions (*Zalophus californianus*), Harbor Porpoises (*Phocoena phocoena*) and Northern Elephant Seals (*Mirounga angustirostris*). In D. Brown, y A. Bertaccini (Eds.), *18th Congress of the International Organization of Mycoplasmology: Program and Abstracts* (p. 62). Chiachiano Terme, Siena, Italia.

453. **Volokhov, D., Rust, L., Soper, J., Ríos, C., Gulland, F. M., Davidson, M., y Chizhikov, V. E. (2012B)**. Novel *Ureaplasma* spp. Detected in California Sea Lions (*Zalophus californianus*) and Northern Elephant Seals (*Mirounga angustirostris*). In C. Citti (Ed.), *Book of Abstracts: 19th Congress of the International Organisation for Mycoplasmaology*, (p. 812). Toulouse, Francia.
454. **Wada, H., y Netz, R. (2009)**. Hydrodynamics of helical-shaped bacterial motility. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 80(2 Pt 1), p. 021921.
455. **Waites, K., y Talkington, D. (2005)**. New Developments in Human Diseases Due to *Mycoplasmas*. In A. Blanchard, y G. Browning (Eds.), *Mycoplasmas: Molecular Biology, Pathogenicity and Strategies for Control* (pp. 289-354). Norfolk: Horizon Bioscience.
456. **Waites, K., Rudd, P., Crouse, D., Canupp, K., Nelson, K., Ramsey, C., y Cassell, G. (1988)**. Chronic *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infections of central nervous system in preterm infants. *Lancet*, 1(8575-6), pp. 17-21.
457. **Walsby, A. (1994)**. Gas vesicles. *Microbiol Rev*, 58(1), pp. 94-144.
458. **Wang, H. (2011)**. *Intestinal Bacterial Diversity Analysis Of Eight Marine Economic Animals (Tesina de Máster)*. Qingdao: Institute of Oceanology - Chinese Academy of Sciences.
459. **Wang, R., Shih, J., Weiss, S., Grandinetti, T., Pierce, P., Lange, M., Alter, H.J., Wear, D.J., Davies, C., Mayur, R.K., y Lo, S. (1993)**. *Mycoplasma penetrans* infection in male homosexuals with AIDS: high seroprevalence and association with Kaposi's sarcoma. *Clin Infect Dis*, 17(4), pp. 724-729.
460. **Wang, W. (2011)**. Bacterial diseases of crabs: A review. *J Invertebr Pathol*, 106(1), pp. 18-26.
461. **Wang, W., Gu, W., Ding, Z., Ren, Y., Chen, J., y Hou, Y. (2005)**. A novel Spiroplasma pathogen causing systemic infection in the crayfish *Procambarus clarkii* (Crustacea: Decapoda), in China. *FEMS Microbiology Letters*, 249, pp. 131-137.

Referencias bibliográficas

462. Wang, W., Gu, W., Gasparich, G., Bi, K., Ou, J., Meng, Q., Liang, T., Feng, Q., Zhang, J., y Zhang, Y. (2011). *Spiroplasma eriocheiris* sp. nov., associated with mortality in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Int J Syst Evol Micr*, 61, pp. 703-708.
463. Wang, W., Wen, B., Gasparich, G., Zhu, N., Rong, L., Chen, J., y Xu, Z. (2004A). A spiroplasma associated with tremor disease in the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Microbiology*, 150, pp. 3035-3040.
464. Wang, Y., Stingl, U., Anton-Erxleben, F., Geisler, S., Brune, A., y Zimmer, M. (2004B). "Candidatus Hepatoplasma crinochetorum," a new, stalk-forming lineage of Mollicutes colonizing the midgut glands of a terrestrial isopod. *Appl Environ Microbiol*, 70(10), pp. 6166-6172.
465. Ward, N., Steven, B., Penn, K., Methé, B., y Detrich, W. (2009). Characterization of the intestinal microbiota of two Antarctic notothenioid fish species. *Extremophiles*, 13(4), pp. 679-685.
466. Watanabe, T., Shibata, K., Yoshikawa, T., Dong, L., Hasebe, A., Domon, H., Kobayashi, T., y Totsuka, Y. (1998). Detection of *Mycoplasma salivarium* and *Mycoplasma fermentans* in synovial fluids of temporomandibular joints of patients with disorders in the joints. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 22(3), pp. 241-246.
467. Weisburg, W., Tully, J., Rose, D., Petzel, J., Oyaizu, H., Yang, D., Mandelco, L., Sechrest, J., Lawrence, T.G., Van Etten, J., y Woese, C. (1989). A Phylogenetic Analysis of the Mycoplasmas: Basis for Their Classification. *J Bacteriol*, 171(12), pp. 6455-6467.
468. Westberg, J., Persson, A., Holmberg, A., Goesmann, A., Lundeberg, J., Johansson, K., Pettersson, B., y Uhlén, M. (2004). The genome sequence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC type strain PG1T, the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). *Genome Res*, 14(2), pp. 221-227.
469. Whitcomb, R. (1983). Culture media for spiroplasmas. In J. Tully, y R. Whitcomb (Eds.), *Methods in Mycoplasmaology* (Vol. I, pp. 147-158). New York: Academic Press.

470. **Williams, C., y Wittler, R. (1971).** Hydrolysis of Aesculin and Phosphatase Production by Members of the Order *Mycoplasmatales* Which Do Not Require Sterol. *Int J Syst Bacteriol*, 21, pp. 73-77.
471. **Williamson, D. L., y Whitcomb, R. F. (1975).** Plant *Mycoplasmas*: a cultivable spiroplasma causes corn stunt disease. *Science*, 188(4192), pp. 1018-1020.
472. **Williamson, D., Gasparich, G., Regassa, L., Saillard, C., Renaudin, J., Bové, J., y Whitcomb, R. (2010).** Family II. Spiroplasmataceae Skripal 1983, 408VP. In N. Krieg, J. Staley, D. Brown, B. Hedlund, B. Paster, N. Ward, . . . W. Whitman (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. IV, pp. 654-686). New York: Springer.
473. **Wilson, M., y Collier, A. (1976).** Ultrastructural study of *Mycoplasma pneumoniae* in organ culture. *J Bacteriol*, 125(1), pp. 332-339.
474. **Windsor, D., Bradbury, J., y Dare, C. (2010).** A putative *Mycoplasma* species isolated from a salt-water fish. In D. Brown, y A. Bertaccini (Eds.), *18th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology: Program and Abstracts* (p. 180). Chianciano Terme, Siena, Italia.
475. **Wirth M., Berthold E., Grashoff M., Pftzner H., Schubert, U., y Hauser H. (1994).** Detection of mycoplasma contaminations by the polymerase chain reaction. *Cytotechnology*, 16(2), pp 67-77.
476. **Woese, C. (1987).** Bacterial evolution. *Microbiol Rev*, 51(2), pp. 221-271.
477. **Woese, C. R., y Fox, G. (1977).** Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Evolution*, 74(11), pp. 5088-5090.
478. **Woese, C., Maniloff, J., y Zablen, L. (1980).** Phylogenetic analysis of the Mycoplasmas. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 77(1), pp. 494-498.
479. **Woese, C., Stackebrandt, E., y Ludwig, W. (1985).** What are Mycoplasmas: the relationship of tempo and mode in bacterial evolution. *J Mol Evol*, 21(4), pp. 305-316.
480. **Woods, J., Brewer, M., Hawley, J., Wisnewski, N., y Lappin, M. (2005).** Evaluation of experimental transmission of *Candidatus Mycoplasma haemominutum* and *Mycoplasma haemofelis* by Ctenocephalides felis to cats. *Am J Vet Res*, 66(6), pp. 1008-1012.

Referencias bibliográficas

481. **Woods, L., y Smith, T. (1972).** Tetrazolium agar overlay in test for *Mycoplasma pneumoniae*. *Appl Microbiol*, 24(1), pp. 148-149.
482. **Work, T., y Aeby, G. (2011).** Pathology of tissue loss (white syndrome) in *Acropora* sp. corals from the Central Pacific. *J Invertebr Pathol*, 107(2), pp. 127-131.
483. **Wu, H., y Miyata, M. (2012).** Whole surface image of *Mycoplasma mobile*, suggested by protein identification and immunofluorescence microscopy. *J Bacteriol*, 194(21), pp. 5848-5855.
484. **Wu, S., Tian, J., Wang, G., Li, W., y Zou, H. (2012).** Characterization of bacterial community in the stomach of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *World J Microbiol Biotechnol*, 28(5), pp. 2165-2174.
485. **Yang, J., y Wu, Y. (1992).** Electron microscope study on *Mycoplasmas*-like of penaeid shrimp (*Penaeus chinensis*). *Journal of the Zhejiang Society of Oceanography & the Second Institute of Oceanography*, 10(4), pp. 63-67.
486. **Yarza, P., Ludwig, W., Euzéby, J., Amann, R., Schleifer, K. H., Glöckner, F. O., y Rosselló-Móra, R. (2010).** Update of the All-Species Living Tree Project based on 16S and 23S rRNA sequence analyses. *Syst Appl Microbiol*, 33(6), pp. 291-299.
487. **Yavari, C. A. (2010).** *Studies on a Mycoplasma gallisepticum-like organism isolated from the Humboldt penguin (Spheniscus humboldti)* (Tesis de Doctorado). Liverpool, U.K.: University of Liverpool.
488. **Yoder, H. (1990).** Avian *Mycoplasmas*. In G. Carter, y J. Cole (Eds.), *Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology* (5 ed., pp. 237-243). New York: Academic Press.
489. **Yu, H., Liu, S., Ruan, K., Chen, Y., y Wang, Z. (2009).** Advances in classification and biodiversity of spiroplasmas--a review [Resumen en inglés]. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 49(5), pp. 567-572.
490. **Zbinden, M., y Cambon-Bonavita, M. (2003).** Occurrence of Deferribacterales and Entomoplasmatales in the deep-sea Alvinocarid shrimp *Rimicaris exoculata* gut. *FEMS Microbiology Ecology*, 46, pp. 23-30.

491. **Zhao, S., Sun, B., Lang, J., Qiu, J., He, J., Qiang, B., Wang, H., Ying, X., Ye, Q., y Sun, A. (2006).** Detection of Mycoplasma infection in human laryngeal carcinoma. *AJSMMU*, 27(8), pp. 817-819.
492. **Zhi, Y., Mayhew, A., Seng, N., y Tackle, G. B. (2010).** Validation of a PCR method for the detection of mycoplasmas according to European Pharmacopoeia section 2.6.7. *Biologicals*, 38 (2), pp. 232-237.
493. **Zimmer, R., y Woollacott, R. (1983).** *Mycoplasma*-Like Organism: Ocurrence with the Larvae and Adults of a Marine Bryozoan. *Science*, 220, pp. 208-210.