

CAMBIOS EN LA MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS DE *Mycoplasma spp.* SOMETIDAS A LA ACCIÓN DE DIVERSOS INACTIVANTES

DE LA FE, CH.; ASSUNÇÃO, P.; RAMIREZ, A. S.; DÍAZ, M. J.; DÍAZ-BERTRANA, L. Y POVEDA, J. B.

Unidad de Epidemiología y Medicina Preventiva. Facultad de Veterinaria, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Trasmontaña s/n. 35416 Arucas (España). E-mail: davidc@cicei.ulpgc.es

RESUMEN

La agalaxia contagiosa es una enfermedad de los pequeños rumiantes que ocasiona grandes pérdidas económicas en toda el área mediterránea. Cuatro especies de mycoplasmas pueden estar implicadas en el síndrome: *Mycoplasma agalactiae*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (LC), *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* y *Mycoplasma putrefaciens*. Todas estas especies, adoptan la morfología típica de huevo frito cuando crecen en medio sólido. En este trabajo, presentamos la diversa morfología de la colonia o pseudocolonia que pueden adoptar estas especies cuando son sometidas a la acción de diversos inactivantes en concentraciones que no resultan letales para las mismas, y que pueden llegar a confundirnos al observarlos mediante microscopía óptica.

Palabras clave: mycoplasma, agalaxia contagiosa, morfología de las colonias, inactivantes.

INTRODUCCIÓN

La agalaxia contagiosa es una de las enfermedades más importantes que afectan a los pequeños rumiantes. Declarada como endémica en la casi totalidad de los países del área mediterránea, Garrido *et al* (1987) consideran que afecta a la práctica totalidad de España.

Cuatro especies de mycoplasma pueden ser artífices del síndrome, *Mycoplasma agalactiae*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (LC), *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* y *Mycoplasma putrefaciens*.

Se han empleado diferentes vacunas inactivadas como medida profiláctica y de control de la enfermedad en muchos países como Grecia, Sarris *et al* (1989), España (León Vizcaíno *et al*, 1995) o Italia (Tola *et al*, 1999), utilizando diversos productos, principalmente el formol a diferentes concentraciones (Foggie *et al*, 1971, Bar-Moshe *et al*, 1984, Villalba *et al*, 1991, León-Vizcaíno *et al*, 1995 o Tola *et al*, 1999) como agente inactivante.

Aunque en general, la morfología de los micoplasmas es extremadamente variable (formas esféricas, cocoideas, filamentosas o filamentosas helicoidales), la mayoría de las especies de micoplasma, presentan la apariencia característica de "huevo frito", producida al crecer la colonia en el medio, cuando se cultivan en condiciones normales (Contreras *et al*, 1993; Marco *et al*, 1993).

Dentro de las experiencias de inactivación llevadas a cabo por nuestro grupo (datos no publicados), hemos evaluado los cambios morfológicos producidos en cepas de campo de *Mycoplasma spp.* (que presentan morfología típica de huevo frito en condiciones normales) al someterlas a la acción de diversos inactivantes aplicados a una concentración que resulta ser no bactericida.

La presencia de alguna de estas formas atípicas de *M. agalactiae*, *M. mycoides* subsp. *mycoides* (LC) *M. putrefaciens* o *M. capricolum* subsp. *capricolum* puede inducirnos a error a la hora de confirmar la inactivación de cualquier cultivo destinado a la producción de vacunas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas y condiciones de crecimiento

Se utilizaron cepas de campo de *Mycoplasma agalactiae*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (LC), *Mycoplasma putrefaciens* y *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* procedentes de diferentes rebaños afectados de agalaxia contagiosa en el territorio español. Las cepas se sembraron en tubos de dos ml de medio de cultivo líquido especial para micoplasmas, el medio PH (Kirchhoff y Rosengarten, 1984). La incubación se realizó a 37°C durante 24 a 72 horas. Para observar la morfología de las colonias se utilizó el medio PH sólido (Kirchhoff y Rosengarten, 1984). La incubación de las placas se realizó en idénticas condiciones.

Agentes inactivantes

Como agentes inactivantes, se emplearon formol, Quil-A (saponina purificada), fenol y etilenimina binaria (BEI) de diversas casas comerciales. También se empleó el calor suministrado mediante baño de temperatura (Selecta Precistern 6000140) y estufa (Selecta 80L).

Protocolo

Los cultivos líquidos de micoplasma en fase logarítmica de crecimiento, fueron sometidos a la acción de los diferentes agentes inactivantes pero a unas concentraciones que nuestras experiencias previas mostraron no ser bactericidas. Una vez transcurrido el tiempo indicado en el protocolo, 500 µl de cultivo líquido fueron inoculados en el medio PH sólido para observar el posible efecto negativo de los diferentes agentes en la morfología de las colonias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvo crecimiento de colonias en todos los cultivos, pero con la aplicación de determinadas concentraciones de formol, BEI y fenol, no apreciamos unos cambios morfológicos realmente importantes en las cepas de campo de las 4 especies de micoplasma utilizadas. El mismo fenómeno sucede al aplicar tratamiento térmico en condiciones no bactericidas.

Con el uso del Quil-A (saponina modificada), si que apreciamos colonias atípicas o pseudocolonias en cepas de *M. agalactiae*, *M.m.m.* (LC), *M. capricolum capricolum* y *M. putrefaciens*. Estas colonias, aparecen utilizando un intervalo de concentraciones variable (desde un mg/ml. hasta tres mg/ml.), y las condiciones de temperatura y tiempo, también varían de unas especies a otras.

En el caso de *M. agalactiae*, observamos estas colonias o pseudocolonias al someter a las cepas a una concentración de dos o tres mg/ml. del producto, manteniéndolas a temperatura ambiente de 16-24 horas, o 37°C durante 16 horas. Esta concentración de saponina (tres mg/ml.) se ha mostrado eficaz a la hora de inactivar otros micoplasmas caprinos como la cepa F38 de *M. capricolum capripneumoniae*, agente causal de la pleuroneumonía contagiosa caprina (Rurangirwa *et al*, 1987), pero, aunque parece inducir cambios morfológicos importantes, no logra inactivar los cultivos de *M. agalactiae*. Un hecho similar parece suceder en el caso de *M. capricolum capricolum*, aunque también en este caso con concentraciones del orden de un mg/ml. también observamos estas colonias.

Con las cepas de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (LC) y *M. putrefaciens* observamos fenómenos opuestos. Mientras que en el caso de *M. putrefaciens*, tan sólo una concentración de tres mg/ml. a 37°C es capaz de ocasionar los cambios estructurales apreciados, en las cepas de Mmm (LC) tan sólo observamos estas colonias cuando utilizamos una concentración de un mg/ml., puesto que a concentraciones mayores la morfología de las mismas es normal.

La morfología de los micoplasmas es extremadamente variable, dando lugar a formas esféricas, cocoideas, filamentosas o filamentosas helicoidales, y ciertas especies pueden mostrar una tendencia a favor de una de dichas formas morfológicas. Sabemos, no obstante, que la composición del medio de cultivo influye notablemente en la forma, (Rodwell y Mitchell, 1979; Miles, 1992), y, nuestros resultados parecen indicar que el efecto ejercido por este agente inactivante sobre las cepas de micoplasma, se traduce en la aparición de pseudocolonias o colonias de características morfológicas muy diferentes a las apreciadas generalmente en la especie afectada. Además, otro dato muy importante y a tener en cuenta, es el tiempo transcurrido entre la inoculación del medio sólido y la aparición de algunas colonias. Algunas cepas han crecido una vez transcurridos de seis a ocho días de incubación, en condiciones óptimas de crecimiento y humedad, cuando generalmente, esas mismas cepas, mostraban colonias típicas entre 24 y 76 horas de incubación. Este dato, podría hacernos emitir un resultado de falso negativo en algunos casos.

CONCLUSIONES

La saponina purificada, (Quil-A) es el único de todas los agentes inactivantes que hemos utilizado que produce el crecimiento de colonias o pseudocolonias de morfología atípica. Este proceso parece afectar a las cepas de las cuatro especies de micoplasma utilizadas en esta experiencia, *M. agalactiae*, *M.m.m.* (LC), *M. putrefaciens* y *M. capricolum capricolum*, si bien algunas de ellas parecen sufrir con más facilidad este cambio morfológico.

Debe prestarse especial atención a este tipo de procesos que pueden conllevar la emisión de un diagnóstico falso negativo a la hora de comprobar la inactivación de determinados cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

- BAR-MOSHE, B.; RAPOPORT, E. y BRENNER, J., 1984. Vaccination trials against *Mycoplasma mycoides* subsp. *Mycoides* (Large Colony type) infection in goats. *Israel Journal of Medical Sciences*, 20, 972-974.
- CONTRERAS, A.; CORRALES, J. C.; ROMEO, L. Y. y MARCO, J. C. (1993). Etiología de la Agalaxia Contagiosa. *OVIS Aula Veterinaria* 29: 9-25.
- FOGGIE, A.; ETHERIDGE, J. R.; ERDAG, O. y ARISOY, F. 1971. Contagious agalactia of sheeps and goats studies on live and dead vaccines in lactating sheep. *Journal of Comparative Pathology*, 81, 1, 165-172.
- GARRIDO, F.; LEÓN, L.; LADERO, J. L.; CUELLAR, L. y DÍAZ M. A. 1987. Contagious Agalactia in Spain. *CEC Meeting on CA. Niza*, 1-5.
- KIRCHHOFF, H. y ROSENGARTEN, R. 1984. Isolation of a motile mycoplasma from fish. *J. Gen. Microbiol.* 130: 2439-2445.
- LEÓN VIZCAÍNO, L.; GARRIDO ABELLÁN, F.; CUBERO PABLO, M. J. y PERALES, A. 1995. Immunoprophylaxis of caprine contagious agalaxia due to *Mycoplasma agalactiae* with an inactivated vaccine. *The Veterinary Record*. 137, 266-269.
- MARCO, J. C.; CORRALES, J. C.; EXTAMIANA, A. B. y CONTRERAS, A. (1993). Epidemiología. *OVIS Aula Veterinaria* 29: 27-48.
- MILES, R. J. 1992. Cell nutrition and growth. En: *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis*, 23-40. Ed. Maniloff, McElhaney, Finch y Baseman. American Society for Microbiology, Washington, D.C (USA).
- RODWELL, A. W. y MITCHELL, A. 1979. Nutrition, growth, and reproduction. En: *The Mycoplasmas, vol. I*, 103-139. Ed. Barile and Razin Academic Press, New York (USA)
- RURANGIRWA, F. R.; MCGUIRE, T. C.; KIBOR, A. y CHEMA, S. 1987. An inactivated vaccine for contagious caprine pleuropneumonia. *Veterinary Record*, 121, 397-402.
- SARRIS, K.; ZDRAKAS, A.; PAPASTERIADIS, A. y PAPADOPOULOS, O. 1989. Experimental contagious agalactia vaccine. *Bull. Hellenic vet. Med. Soc.*, 40, 71-74.

- TOLA, S.; MANUNTA, D.; ROCCA, S.; ROCCHIGIANI, A. M.; IDINI, G.; ANGIOI, P. P. y LEORI, G. 1999. Experimental vaccination against *Mycoplasma agalactiae* using different inactivated vaccines. *Vaccine* Vol. **17**: 2764-2768.
- VILLALBA, E. J.; POVEDA, J. B.; GARRIDO, A.; GARRIDO, F. y FERNANDEZ, A. 1991. Inmunización de cabras contra *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (LC) en un caso de agalaxia persistente. Actas de las XIV Jornadas Científicas de la SEOC, 377-381

SUMMARY

Contagious agalactia is a small ruminant disease that causes high economic losses in all the Mediterranean area. Four species of mycoplasma may be implied in the syndrome: *Mycoplasma agalactiae*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (LC), *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* and *Mycoplasma putrefaciens*. All these species, adopt the typical morphology of "fried egg" when they grow up in a solid medium. In this work, we introduce the diverse morphology of the colony or pseudocolony which these species can adopt when they are submitted to the action of several inactivants in concentrations that aren't lethal for them, and that may make us confused when watching them by optical microscopy.

Key words: mycoplasma, contagious agalactia, morphology of the colony, inactivants.
