

# ESTUDIO DEL GEN DEL ARN RIBOSOMAL 23S DE MICOPLASMAS DE RUMIANTES Y SU RELACIÓN CON RESISTENCIAS A MACRÓLIDOS

Lidia Esther Mederos Iriarte

2017

Tesis doctoral





**Anexo I**





**Anexo II**

**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**

Departamento: **Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria**

Programa de Doctorado: **Sanidad Animal**

**Título de la Tesis**

**“Estudio del gen del ARN ribosomal 23S de micoplasmas de rumiantes y su relación con resistencias a macrólidos”**

Tesis Doctoral presentada por **Dña. Lidia Esther Mederos Iriarte**

Dirigida por la **Dra. Ana Sofía Ramírez Corbera**, el **Dr. Rubén Sebastián Rosales Santana** y la **Dra. M<sup>º</sup> del Mar Tavío Pérez**.

La Directora,

El Director,

La Directora,

El Doctorando,

Ana S. Ramírez  
Corbera

Rubén S. Rosales  
Santana

M<sup>º</sup> del Mar Tavío  
Pérez

Lidia E. Mederos  
Iriarte

Arucas, a 2 de Junio de 2017





**ANA S. RAMÍREZ CORBERA, TITULAR DE UNIVERSIDAD DEL ÁREA DE CONOCIMIENTO DE SANIDAD ANIMAL Y PARTE DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN DE EPIDEMIOLOGÍA Y MEDICINA PREVENTIVA VETERINARIA DEL INSTITUTO UNIVERSITARIO DE SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA,**

INFORMA:

Que **Dña. Lidia Esther Mederos Iriarte**, Licenciada en Veterinaria por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado **“Estudio del gen del ARN ribosomal 23S de micoplasmas de rumiantes y su relación con resistencias a macrólidos”**, el cual considero reúne las condiciones y calidad científica para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Las Palmas de Gran Canaria a 2 de Junio de 2017

Fdo: Profa. Dra. Ana S. Ramírez Corbera





**RUBÉN S. ROSALES SANTANA, PROFESOR ASOCIADO DE UNIVERSIDAD DEL ÁREA DE SANIDAD ANIMAL Y PARTE DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN DE EPIDEMIOLOGÍA Y MEDICINA PREVENTIVA VETERINARIA DEL INSTITUTO UNIVERSITARIO DE SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA,**

INFORMA:

Que **Dña. Lidia Esther Mederos Iriarte**, Licenciada en Veterinaria por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado **“Estudio del gen del ARN ribosomal 23S de micoplasmas de rumiantes y su relación con resistencias a macrólidos”**, el cual considero reúne las condiciones y calidad científica para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Las Palmas de Gran Canaria a 2 de Junio de 2017

Fdo: Prof. Dr. Rubén S. Rosales Santana





**M<sup>a</sup> DEL MAR TAVÍO PÉREZ, CATEDRÁTICA DE UNIVERSIDAD DEL ÁREA DE MICROBIOLOGÍA Y PARTE DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN DE EPIDEMIOLOGÍA Y MEDICINA PREVENTIVA VETERINARIA DEL INSTITUTO UNIVERSITARIO DE SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA,**

INFORMA:

Que **Dña. Lidia Esther Mederos Iriarte**, Licenciada en Veterinaria por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado **“Estudio del gen del ARN ribosomal 23S de micoplasmas de rumiantes y su relación con resistencias a macrólidos”**, el cual considero reúne las condiciones y calidad científica para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Las Palmas de Gran Canaria a 2 de Junio de 2017

Fdo: Profa. Dra. M<sup>a</sup> del Mar Tavío Pérez



# Agradecimientos

---



Esta tesis doctoral no hubiese sido posible sin el esfuerzo y la ayuda de muchas personas que han estado conmigo durante este largo camino. Aún a riesgo de olvidar a alguien, quisiera dedicar este trabajo a mi madre, gracias a la cual he llegado a ser quien soy gracias a su educación y valores.

Agradecer a mis directores de tesis, sin los cuales esto no hubiese sido posible, muchísimas gracias Ana por confiar en mí y darme todo tu apoyo, Rubén por tener esa paciencia conmigo y M<sup>a</sup> del Mar por esos grandes consejos. A Bismarck por sus consejos y buena disposición. A Mercedes, mi mami del IUSA. A Carlos Gutiérrez por ayudarme con los dromedarios. A Lucía Manso-Silván y Francois Thiarcourth, por acogerme en el CIRAD.

También dar gracias a mi familia, mi padre, hermanos, sobrinos, madre política y a Ayoze, por aguantar esos nervios y ese carácter tan mío y saber calmarme en muchas ocasiones y darme empujones en otras. Como no, a mis amigas, Gara, Delia, Lucía y Leonor, que han tenido que soportarme a mí y mis capítulos, gracias por esos ratos de lectura echados.

A mis compañeros de laboratorio, Carlos, Alejandro y Orestes, no podría haber tenido mejores maestros y amigos. A las técnicas de laboratorio Esther y Manola, que preparaban medios, placas y lo que necesitásemos, además de tener siempre alguna palabra de ánimo. A los compañeros de infecciosas y de parasitología, que hubiese sido de mí sin Leire y Adassa y su microscopio con cámara.



# Índice

---



---

<b>ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>XI</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>XIX</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>XXI</b>
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>8</b>
1.2.1. Taxonomía y Filogenia de los Mollicutes .....	8
1.2.2. Características generales .....	12
1.2.3. Ultraestructura.....	17
1.2.4. Requerimientos orgánicos .....	19
1.2.5. Factores biofísicos que inciden en el crecimiento .....	20
1.2.6. Resistencia a los agentes físico-químicos.....	22
1.2.7. Hábitat .....	22
1.2.8. Identificación y caracterización.....	24
1.2.8.1. Requerimiento en esteroides.....	25
1.2.8.2. Métodos bioquímicos y enzimáticos.....	25
1.2.8.2.1. Fermentación de la glucosa .....	26
1.2.8.2.2. Hidrólisis de la urea.....	27
1.2.8.2.3. Hidrólisis de la arginina .....	28
1.2.8.2.4. Actividad de la fosfatasa .....	29
1.2.8.2.5. Reducción del tetrazolium .....	30
1.2.8.2.6. Formación de películas y cristales.....	30
1.2.8.3. Perfiles de proteínas totales .....	31
1.2.8.4. Métodos serológicos.....	31
1.2.8.4.1. Inhibición del crecimiento.....	31
1.2.8.4.2. Inhibición del metabolismo.....	31
1.2.8.4.3. Inmunofluorescencia.....	31
1.2.8.5. Inmunohistoquímica .....	33

1.2.8.6. Métodos de biología molecular .....	33
1.2.8.6.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	33
1.2.8.6.2. Secuenciación de ADN .....	34
1.2.8.6.3. PCR a tiempo real.....	36
1.2.8.6.4. DGGE.....	36
1.2.8.6.5. Microarrays.....	38
1.2.8.6.6. Tipificación bacteriana.....	38
1.2.9. Patogenicidad y factores de virulencia .....	43
1.2.10. Grupo <i>Mycoplasma mycoides</i> .....	45
1.2.10.1. <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp <i>mycoides</i> (Mmm).....	51
1.2.10.2. <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp <i>capri</i> (Mmc).....	54
1.2.10.3. <i>Mycoplasma capricolum</i> subsp <i>capricolum</i> (Mcc).....	56
1.2.10.4. <i>Mycoplasma capricolum</i> subsp <i>capripneumoniae</i> (Mccp).....	57
1.2.10.5. <i>Mycoplasma leachii</i> .....	59
1.2.10.6. <i>Mycoplasma cottewii</i> y <i>Mycoplasma yeatsii</i> .....	60
1.2.10.7. <i>Mycoplasma putrefaciens</i> .....	61
1.2.10.8. <i>Mycoplasma feriruminatoris</i> .....	61
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>65</b>
<b>2.1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>67</b>
<b>2.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>71</b>
2.2.1. Especies bacterianas estudiadas.....	71
2.2.2. Identificación por cultivo y clonaje de colonias .....	71
2.2.3. Características bioquímicas y enzimáticas.....	73
2.2.4. Extracción de ADN .....	75
2.2.5. Confirmación de la identificación mediante secuenciación del gen ARNr 16S.....	76
2.2.6. Amplificación de la región región intergénica 16S-23S ARNr y evaluación diagnóstica basada en DGGE de esta región.....	77
2.2.7. Amplificación de gen codificante para el ARNr 23S.....	79
2.2.8. Amplificación de la región región intergénica 23S-5S ARNr .....	81
2.2.9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	82

---

2.2.10.	Electroforesis de los productos amplificados .....	83
2.2.11.	Secuenciación.....	83
2.2.12.	Herramientas informáticas de análisis de secuencias.....	84
2.2.12.1.	FinchTV (versión 1.4.0) .....	84
2.2.12.2.	Gene Runner (versión 3.0.1).....	84
2.2.12.3.	Bioedit (versión 7.0.9) .....	85
2.2.12.4.	Mega (versión 5.0.3).....	85
<b>2.3.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>85</b>
2.3.1.	Características de las colonias y perfil bioquímico y enzimático .....	85
2.3.2.	Extracción de ADN, PCR convencional y electroforesis.....	87
2.3.3.	Control de calidad de los micoplasmas basado en el gen ARNr 16S.....	88
2.3.4.	Análisis de secuencias de la región intergénica 16S-23S ARNr .....	89
2.3.5.	Análisis de secuencias del gen 23S ARNr .....	93
2.3.6.	Análisis de secuencias de la región intergénica 23S-5S ARNr .....	95
2.3.7.	Resultados DGGE para la región intergénica 16S-23S.....	97
<b>2.4.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>98</b>
<b>CAPÍTULO 2 – ANEXOS.....</b>		<b>109</b>
<b>ANEXO 2.1. MEDIOS Y REACTIVOS EMPLEADOS .....</b>		<b>111</b>
<b>ANEXO 2.2. ALINEAMIENTO COMPLETO DEL GEN 23S.....</b>		<b>118</b>
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>		<b>123</b>
<b>3.1. INTRODUCCIÓN .....</b>		<b>125</b>
3.1.1.	Mecanismos de resistencia a antimicrobianos .....	126
3.1.2.	Poder antimicrobiano del extracto de <i>Artemisia vulgaris</i> L.....	127
3.1.3.	Definición y valoración de la CMI.....	130
3.1.4.	Finalidad y objetivos .....	134
<b>3.2.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>135</b>
3.2.1.	Caracterización de la resistencia a eritromicina .....	135
3.2.2.	Colorimetría .....	139
3.2.3.	Determinación de la actividad <i>in vitro</i> del extracto de <i>Artemisia vulgaris</i> L.....	140
3.2.4.	Preparación del inóculo .....	141

3.2.5.	Preparación de placas de microdilución para determinación de CMIs .....	143
3.2.6.	Preparación de las soluciones stock de los antibióticos ensayados .....	144
3.2.7.	Determinación de los valores de CMIs para antibióticos y extractos de <i>Artemisia vulgaris</i> L. ....	144
<b>3.3.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>145</b>
3.3.1.	Caracterización del gen 23S ARNr de cepas resistentes a eritromicina.....	145
3.3.1.1	Valores de CMI de eritromicina .....	145
3.3.1.2.	Frecuencias de selección de colonias resistentes a eritromicina. ....	146
3.3.1.3.	Secuenciación cepas resistentes a eritromicina .....	149
3.3.2.	Actividad in vitro del extracto de <i>Artemisia vulgaris</i> L. ....	153
3.3.3.	Valores CMI de espiramicina y lincomicina en las cepas de referencia del estudio .	155
<b>3.4.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>157</b>
<b>CAPÍTULO 4 .....</b>	<b>169</b>	
<b>4.1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>171</b>
<b>4.2.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>174</b>
4.2.1.	Primera fase.....	174
4.2.1.1.	Toma de muestras y condiciones de cultivo.....	174
4.2.1.2.	Pruebas bioquímicas .....	177
4.2.1.3.	Extracción de ADN y PCR .....	177
4.2.1.4.	Secuenciación y análisis de las secuencias .....	178
4.2.2.	Segunda fase.....	179
4.2.2.1.	Toma de muestras y condiciones de cultivo .....	180
4.2.2.2.	Extracción de ADN y secuenciación .....	181
4.2.3.	Almacenamiento de los cultivos .....	181
<b>4.3.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>182</b>
<b>4.4.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>194</b>
<b>CONCLUSIONES: .....</b>	<b>207</b>	
<b>RESUMEN .....</b>	<b>211</b>	
<b>SUMMARY .....</b>	<b>219</b>	
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>227</b>	

## **Índice de tablas y figuras**

---



**Índice de tablas**

<b>Tabla 1.1.</b>	Diferencias entre mollicutes, bacterias y virus.....	Pág. 9
<b>Tabla 1.2.</b>	Taxonomía de la Clase <i>Mollicutes</i> . Adaptado de Brown y cols. (2010b).....	Pág. 11
<b>Tabla 1.3.</b>	Comparación de la taxonomía del grupo <i>M. mycoides</i> .....	Pág. 49
<b>Tabla 2.1.</b>	Especies y cepas empleadas en el estudio.....	Pág. 71
<b>Tabla 2.2.</b>	Cebadores empleados en la secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S .....	Pág. 77
<b>Tabla 2.3.</b>	Protocolo de amplificación por PCR empleado para la obtención de productos amplificados destinados a secuenciación .....	Pág. 77
<b>Tabla 2.4.</b>	Cebadores empleados en la secuenciación de la región intergénica 16S-23S ARNr .....	Pág. 78
<b>Tabla 2.5.</b>	Cebadores empleados en la PCR destinada a la amplificación del gen	Pág. 79

	que codifica el ARNr 23S previa secuenciación.....	
<b>Tabla 2.6.</b>	Protocolo PCR para segmentos A y F.....	Pág. 81
<b>Tabla 2.7.</b>	Protocolo PCR para segmentos B, C, D y E.....	Pág. 81
<b>Tabla 2.8.</b>	Cebadores empleados en la secuenciación/DGGE de la región intergénica 23S-5S ARNr.....	Pág. 82
<b>Tabla 2.9.</b>	Resumen de resultados de las pruebas bioquímicas/enzimáticas.....	Pág. 87
<b>Tabla 2.10.</b>	Tabla resumen con las diferencias en las secuencias de la región intergénica 16S-23S de <i>M. mycoides</i> subsp <i>capri</i> , <i>M. mycoides</i> subsp <i>mycoides</i> SC, <i>M. mycoides</i> subsp <i>mycoides</i> LC y <i>M. capricolum</i> subsp <i>capricolum</i> y <i>M. leachii</i> .....	Pág. 91
<b>Tabla 2.11.</b>	Porcentajes de similitud entre secuencias de la ISR 16S-23S. Las celdas sombreadas en rojo corresponden al menor valor de similitud detectado. Las celdas sombreadas en azul corresponden a los mayores valores de similitud detectados.....	Pág. 92

<b>Tabla 2.12.</b>	Porcentajes de similitud entre secuencias del gen 23S ARNr. Las celdas sombreadas en rojo corresponden al menor valor de similitud detectado. Las celdas sombreadas en azul corresponden a los mayores valores de similitud detectados.....	Pág. 93
<b>Tabla 2.13.</b>	Tabla resumen con los polimorfismos encontrados en el gen 23S ARNr tras comparación de las cepas en estudio.....	Pág. 94
<b>Tabla 2.14.</b>	Tabla resumen con las diferencias en las secuencias de la región intergénica 16S-23S de las especies pertenecientes al grupo <i>M. mycoides</i> , <i>Mcot</i> , <i>Myeat</i> y <i>Mptr</i> . Los nucleótidos en minúscula, se encuentran únicamente en uno de los operones.....	Pág. 96
<b>Tabla 2.15.</b>	Similitudes entre las diferentes cepas de los miembros del <i>M. mycoides</i> y micoplasmas relacionados al comparar las secuencias de la ISR entre los genes 23S y 5S ARNr.....	Pág. 96
<b>Tabla 3.1.</b>	Especies y cepas de referencia usadas en la determinación de la actividad <i>in vitro</i> del extracto de artemisia.....	Pág. 141
<b>Tabla 3.2.</b>	Especies de micoplasmas y sus cepas correspondientes, para la determinación de MICs de macrólidos.....	Pág. 143

<b>Tabla 3.3.</b>	Valores de CMI de eritromicina en las cepas madre de las mutantes seleccionadas <i>in vitro</i> con eritromicina.....	Pág. 146
<b>Tabla 3.4.</b>	Frecuencias de selección de mutantes para los diferentes experimentos en cada cepa con eritromicina.....	Pág. 147
<b>Tabla 3.5.</b>	Mutantes hallados y confirmados .....	Pág. 148
<b>Tabla 3.6.</b>	Cepas aisladas con mayor resistencia (mutantes) a partir de cada cepa origen.....	Pág. 148
<b>Tabla 3.7.</b>	Diferencias halladas entre las cepas madre y sus resistentes a la eritromicina. T1, T3, T6, T8, ab y E1, cepas resistentes a la eritromicina de las diferentes especies trabajadas. T1/44, a1 y 95043 cepas sensibles a la eritromicina.....	Pág. 151
<b>Tabla 3.8.</b>	Crecimiento en placa de las diferentes cepas de micoplasmas en las concentraciones ensayadas del extracto de <i>Artemisia</i> .....	Pág. 154
<b>Tabla 3.9.</b>	Comparativa valores CMI en antibióticos frente a extracto <i>Artemisia</i> . *Valores obtenidos del estudio realizado en placa con discos	Pág. 156

	impregnados.....	
<b>Tabla 3.10.</b>	Comparativa de los valores de las CMI's obtenidos en MmmLC en medio líquido frente a medio solido.....	Pág. 156
<b>Tabla 4.1.</b>	Enfermedades transmisibles incluidas en la OIE que pueden afectar a los camellos.....	Pág. 173
<b>Tabla 4.2.</b>	Tabla de las muestras tomadas en la primera fase del estudio. *Número de muestras tomadas.....	Pág. 175
<b>Tabla 4.3.</b>	Secuencias utilizadas en la construcción del dendograma y sus números de acceso.....	Pág. 179
<b>Tabla 4.4.</b>	Tabla de las muestras tomadas de vagina de dromedaria en la segunda fase del estudio.....	Pág. 180
<b>Tabla 4.5.</b>	Secuencia del gen 16S ARNr de la cepa <i>Mycoplasma</i> sp. Járama-1).....	Pág. 184
<b>Tabla 4.6.</b>	Resultado del análisis del BLAST SEARCH del gen 16S del ARNr de la cepa de <i>Mycoplasma</i> sp. Járama-1 con los micoplasmas con una	Pág. 184

	mayor similitud.....	
<b>Tabla 4.7.</b>	Secuencia de la cepa <i>Mycoplasma</i> sp. Járama-2 incluyendo el extremo 3' del gen 16S del ARNr y la ISR (nucleótidos en negrita).....	Pág. 187
<b>Tabla 4.8.</b>	Secuencia de la cepa <i>Mycoplasma</i> sp. Járama-1 incluyendo el extremo 3' del gen 16S del ARNr, la ISR y extremo 5' del gen 23S del ARNr (nucleótidos en negrita).....	Pág. 188
<b>Tabla 4.9.</b>	Secuencia parcial del gen 16S del ARNr (van Kuppeveld y cols., 1992 y 1994) de la muestra de oído de la dromedaria Járama. Se cree que se corresponde con la cepa <i>Mycoplasma</i> sp. Járama-2.....	Pág. 189
<b>Tabla 4.10.</b>	Secuencia del gen 23S ARNr de la cepa <i>Mycoplasma</i> sp. Járama-1.....	Pág. 190
<b>Tabla 4.11.</b>	Porcentajes de similitud de la ISR entre las diferentes cepas aisladas de dromedaria.....	Pág. 192
<b>Tabla 4.12.</b>	Número de muestras tomadas en función de la localización y medio utilizado.....	Pág. 192

<b>Tabla 4.13.</b> Información sobre los dromedarios muestreados: nombre, edad, presencia de micoplasmas y secuencia de la ISR.....	Pág. 193
--	----------



**Índice de figuras**

- Figura 1.1.** Agrupación filogenética de la Clase *Mollicutes* incluyendo *Candidatus* Hepatoplasma crinochetorum y *Candidatus* Bacilloplasma..... Pág. 12
- Figura 1.2.** Clasificación taxonómica del género *Mycoplasma* (grupo *pneumoniae*), obtenido del Manual Bergey, vol.4, (Brown y cols., 2010a)..... Pág. 15
- Figura 1.3.** Clasificación taxonómica del género *Mycoplasma* (grupo *hominis*) (Cortesía de Karl-Eric Johansson)..... Pág. 16
- Figura 1.4.** Clasificación taxonómica del género *Mycoplasma* (grupo *spiroplasma*) (Cortesía de Karl-Eric Johansson)..... Pág. 16
- Figura 1.5.** Árbol filogenético obtenido en base a las secuencias del gen 16S del ARNr de especies del grupo *M. mycoides* y especies asociadas..... Pág. 47
- Figura 2.1.** Representación esquemática de la posición de los cebadores empleados para la amplificación por PCR del gen que codifica al
- Pág. 78

	ARNr 16S y la región intergénica 16S-23S ARNr.....	
<b>Figura 2.2.</b>	Representación esquemática de la posición de los cebadores empleados para la amplificación por PCR del gen que codifica al ARNr 23S.....	Pág. 80
<b>Figura 2.3.</b>	Ejemplos de colonias típicas de micoplasma observadas <i>in vitro</i> . A-Myeat, B-Mptr, C-Mmm, D-MmmLC, E-Mcot, F-Mmc.....	Pág. 86
<b>Figura 2.4.</b>	Productos de PCR de la región intergénica entre los genes 16S y 23S ARNr. Orden de carga de muestras: Marcador de peso molecular, MmmLC, Mmm, Mmc, Mcca, Mleach, Mptr, Mcot, Myeat, Marcador de peso molecular. Cabe destacar la presencia de una sola banda y el tamaño similar de las mismas.....	Pág. 88
<b>Figura 2.5.</b>	Secuencia comparativa de la región intergénica 16S-23S de <i>M. yeatsii</i> , <i>M. cottewii</i> y <i>M. putrefaciens</i> .....	Pág. 89
<b>Figura 2.6.</b>	Ejemplo de alineamiento de la secuencia de la ISR 16S-23S ARNr consenso de MmmLC con las secuencias de los operones a y b. Mostrándose detalles de los cromatogramas de las posiciones con	Pág. 90

polimorfismos o doble secuenciación

- Figura 2.7.** Alineamiento de las secuencias de la región intergénica 16S-23S de todas las especies bacterianas a estudio en esta tesis. Y: C/T, R: A/G, W: A/T. Los nucleótidos en minúscula, se encuentran únicamente en uno de los operones..... Pág. 91
- Figura 2.8.** Árbol filogenético obtenido tras el análisis de secuencias de la región intergénica basado en 16S-23S ARNr de las especies bajo estudio. *Mycoplasma agalactiae* PG2 se usó para el análisis con secuencia externa..... Pág. 92
- Figura 2.9.** Árbol filogenético obtenido a partir de secuencias del gen 23S ARNr.. Pág. 95
- Figura 2.10.** Alineamiento de las secuencias de los miembros del grupo *M. mycoides*, Mcot, Myeat y Mptr de la región intergénica entre los genes 23S y 5S ARNr. Los nucleótidos en minúscula, se encuentran únicamente en uno de los operones..... Pág. 95
- Figura 2.11.** Dendograma obtenido con el análisis de las secuencias de las regiones entre los genes 23S y 5S ARNr. *Mycoplasma gallisepticum* Pág. 97

actúa como grupo de referencia externo.....

- Figura 2.12.** Gel de poliacrilamida de DGGE obtenido tras amplificar la región intergénica 16S-23S ARNr de las especies bajo estudio (Mptr (KS1), Myeat (GIH), Mcot (VIS), Mleach (PG50), Mccp (F38), Mcc (California kid), Mmm (PG1), Mmc (PG3) y MmmLC (cepa Y goat))..... Pág. 98
- Figura 3.1.** Cromatograma donde apreciamos polimorfismo y secuencia comparativa de Mmm T1/44, cepa madre y uno de sus mutantes (T8) y *M. pneumoniae*..... Pág. 150
- Figura 3.2.** Cromatograma comparativo cepas resistentes de Mmm 8740 Rita y T1/44. Para las cepas madre de Mccp Abomsa y C1-95043 y sus resistentes a eritromicina se secuenciaron completamente la región que codifica para el ARNr 23S, es decir los 6 fragmentos..... Pág. 150
- Figura 3.3.** Cromatograma donde se visualiza un polimorfismo R (A/G) para Mccp Abomsa..... Pág. 151
- Figura 3.4.** Secuencia comparativa entre Mccp cepa Abomsa sensible a la eritromicina (a1) y cepa resistente a la eritromicina (ab)..... Pág. 151

- Figura 3.5.** Cromatograma donde se visualiza dos polimorfismos Y (T/C) y M (A/C) para Mccp Abomsa..... Pág. 152
- Figura 3.6.** Secuencia comparativa entre Mccp cepa Abomsa sensible a la eritromicina (a1) y cepa resistente a la eritromicina (ab)..... Pág. 152
- Figura 3.7.** Cepa madre Mccp 95043, polimorfismo A/G (R), con su cromatograma..... Pág. 152
- Figura 3.8.** Cepa resistente Mccp 95043 E1, polimorfismo T/C (Y), con su cromatograma..... Pág. 153
- Figura 4.1.** Toma de muestra de vagina de dromedaria con bastoncillo estéril..... Pág. 175
- Figura 4.2.** Colonias de Mycoplasma sp. cepa "Jámara-1" mostrando la típica forma de huevo frito..... Pág. 183
- Figura 4.3.** Árbol filogenético basado en las secuencias del gen 16S ARNr, mostrando la filogenia representativa del grupo *M. bovis* (Grupo *Hominis*), pero con énfasis en el subgrupo *M. bovigenitalium*. *M. mycoides* subsp. *mycoides* PG1<sup>T</sup> del Grupo *Spiroplasma* sirvió de Pág. 185

grupo externo. Los números de acceso al GeneBank de las secuencias se encuentran dentro de los paréntesis. La barra significa que hay 0.02 sustituciones por posición de nucleótido.....

**Figura 4.4.** Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos de PCR de la ISR. Muestras de derecha a izquierda: M: marcador; 1: vagina Jámara; 2: vagina Sáhara (8347) (1); 3: vagina Sáhara (8347) (2); 4: vagina Sáhara (8347) (3); 5: oído Jámara; 6: boca Jámara; 7: oído Sáhara (8347); 8: vagina Jámara (medio de pH suplementado con 10% de urea); 9: *M. sp. Jámara-1* clonado; 10: control (-). La banda señalada con la flecha marca 400 pares de bases..... Pág. 186

**Figura 4.5.** Cromatograma de las ISRs de la muestra obtenida de vagina de la dromedaria Jámara, donde se pueden apreciar dos secuencias de las cuales la correspondiente a la cepa *Mycoplasma* sp. Jámara-2 es la dominante. A: adenina; C: citosina; G: guanina; T: timina..... Pág. 187

**Figura 4.6.** Cromatograma de la ISR del micoplasma cultivado de vagina de la dromedaria Jámara (cepa *M. sp. Jámara-1*). A: adenina; C: citosina; G: guanina; T: timina..... Pág. 188

- Figura 4.7.** Alineamiento de las secuencias de la ISR de las dos cepas detectadas en vagina de la dromedaria Jámara: *M. sp.* Jámara-1 y *M. sp.* Jámara-2. El porcentaje de similitud es de un 48,9%. A: adenina; C: citosina; G: guanina; T: timina..... Pág. 188
- Figura 4.8.** Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos de PCR de la ISR. Muestras de derecha a izquierda: ocho muestras de vagina de dromedaria positivas para micoplasmas (muestras 1-8) y *M. sp.* Jámara-1 (muestra 9)..... Pág. 188
- Figura 4.9.** Detalle del alineamiento de las secuencias de la ISR de cinco de las cepas detectadas en vagina de dromedarias..... Pág. 191



## **Abreviaturas**

---



## Abreviaturas

<b>A.</b>	<i>Acholeplasma</i>
<b>AFLP</b>	Análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados de ADN
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNr</b>	Ácido ribonucleico ribosomal
<b>ARNt</b>	Ácido ribonucleico transferente
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>C/</b>	Clase
<b>CBPP</b>	Perineumonía contagiosa bovina
<b>CCPP</b>	Pleuroneumonía contagiosa caprina
<b>CK</b>	California Kid
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>CPS</b>	Polisacárido capsular
<b>Cq</b>	Ciclo de cuantificación
<b>Da</b>	Dalton
<b>DGGE</b>	Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfato
<b>E.</b>	<i>Escherichia</i>
<b>EPS</b>	Exopolisacáridos
<b>g</b>	Gramo
<b>H</b>	Horas
<b>H<sup>+</sup></b>	Ion hidrógeno
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica
<b>IPTG</b>	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
<b>ISR</b>	"Intergenic spacer región" Región intergénica
<b>kb</b>	Kilobase
<b>KCl</b>	Cloruro potásico
<b>L</b>	Litro
<b>LAMs</b>	Proteínas de membrana asociadas a lípidos
<b>M.</b>	<i>Mycoplama</i>
<b>M</b>	Molar
<b>m</b>	Minutos
<b>mA</b>	Miliamperio
<b>Mbg7</b>	<i>Mycoplasma bovis</i> serogrupo 7
<b>mg</b>	miligramos
<b>ml</b>	Mililitro
<b>MLST</b>	Tipificación multilocus de secuencias
<b>MLVA</b>	Multi-locus tandem repeat analysis
<b>mm</b>	Milímetro

## Abreviaciones

---

<b>mM</b>	Milimolar
<b>Mcc</b>	<i>Mycoplasma capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>
<b>Mcot</b>	<i>Mycoplasma cottewii</i>
<b>Mccp</b>	<i>Mycoplasma capricolum</i> subsp. <i>capripneumoniae</i>
<b>Mleach</b>	<i>Mycoplasma leachii</i>
<b>Mmc</b>	<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>capri</i>
<b>MmmLC</b>	<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> tipo colonias grandes
<b>Mmm</b>	<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> tipo colonias pequeñas
<b>Mptr</b>	<i>Mycoplasma putrefaciens</i>
<b>Myeat</b>	<i>Mycoplasma yeatsii</i>
<b>NaCl</b>	Cloruro sódico
<b>NaOH</b>	Hidróxido sódico
<b>NCTC</b>	National Collection of Type Cultures
<b>ng</b>	Nanogramo
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Búfer fosfato salino
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PCR-RFLP</b>	Análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción tras PCR
<b>PFGE</b>	Electroforesis en gel de campo pulsado
<b>PI</b>	Post infección
<b>qPCR</b>	PCR cuantitativa a tiempo real
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>S</b>	Segundos
<b>Sp</b>	Especie
<b>subsp</b>	Subespecie
<b>UCC</b>	Unidades Cambiadoras de Color
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>µg</b>	Microgramo
<b>µl</b>	Microlitro
<b>µm</b>	Micrómetro
<b>V</b>	Voltios
<b>VNTR</b>	Variable number tandem repeat
<b>VT</b>	Tipo de VNTR
<b>WB</b>	Western blotting





# Capítulo 1

Introducción y revisión bibliográfica

---



### 1.1. Introducción

El interés por los micoplasmas y su identificación ha aumentado enormemente en las últimas décadas, debido a las pérdidas económicas que causan en el ganado y a la dificultad que presenta su aislamiento e identificación. Por ahora el número de especies de *Mollicutes* establecidas se acerca a 200 (Brown y cols., 2010b) y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza como parásitos o comensales de mamíferos, incluidos los humanos, reptiles, peces, artrópodos y plantas (Razin y Hayflick, 2010).

El poder patógeno de las diferentes especies de micoplasmas es muy variable. Clínicamente las micoplasmosis pueden ser manifiestas o latentes. En general se acepta que se trata de enfermedades multifactoriales. La interacción dinámica entre la tríada epidemiológica de micoplasmas, hospedador y medio ambiente puede tener resultados diferentes en diferentes circunstancias. Un estado de comensalismo puede convertirse en parasitismo dependiendo del estado de resistencia del hospedador, por lo que una micoplasmosis subclínica puede convertirse en clínica y viceversa (Ernø, 1987).

Los mollicutes que afectan a los rumiantes han sido objeto de investigación en las últimas décadas de forma exhaustiva. Las enfermedades micoplásmicas constituyen una amenaza para la salud animal y la producción ganadera. El control y la eliminación de estas enfermedades infecciosas constituyen un reto para veterinarios, investigadores e industria. La OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal), ya desde el año 1994, publicó la resolución XI (Infecciones por micoplasmas en los bovinos, ovinos y caprinos: métodos de diagnóstico y control sanitario) donde recomendó a los países miembros crear un sistema de vigilancia, laboratorios

especializados y un laboratorio de referencia nacional para las micoplasmosis. A su vez, la resolución sugería que la mejora de los diagnósticos de las micoplasmosis era vital, pues el diagnóstico microbiológico de estas enfermedades resultaba difícil.

Dentro de los micoplasmas que afectan a los rumiantes domésticos cabe destacar los incluidos dentro del grupo *Mycoplasma (M.) mycoides*, por su patogenicidad (Weisburg y cols., 1989). Actualmente el grupo *M. mycoides* está formado por cinco micoplasmas: *M. mycoides* subsp *mycoides* Small Colony (Mmm), *M. mycoides* subsp *capri* (Mmc), *M. capricolum* subsp *capricolum* (Mcc), *M. capricolum* subsp *capripneumoniae* (Mccp) y *M. leachii* (Manso-Silván y cols., 2009; Thiaucourth y cols., 2011). Este grupo está relacionado con tres micoplasmosis de rumiantes que por su importancia internacional están incluidas en la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la OIE: la perineumonía contagiosa bovina, la pleuropneumonía contagiosa caprina y la agalaxia contagiosa. El agente causal de la pleuroneumonía contagiosa bovina fue el primer micoplasma en ser aislado en 1989 (Nocard y Roux, 1896). La pleuroneumonía contagiosa caprina es una enfermedad que causa graves problemas económicos en África y Asia y su agente causal es el Mccp. Mmc y Mcc son dos de los cuatro micoplasmas implicados en la agalaxia contagiosa. Ésta es una de las principales patologías que afecta la producción del sector caprino a nivel mundial y, muy especialmente, en el área Mediterránea, donde es endémica. En España, incluyendo a todas las islas del Archipiélago Canario, se han descrito importantes pérdidas en la producción caprina causadas por dicha enfermedad.

Nuestro grupo de investigación en la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria lleva investigando los micoplasmas desde principios de los 90s. Durante los años 1996-2000, se llevó a

cabo un proyecto europeo, del que formamos parte. Se trataba de un COST Action 826: Ruminant Mycoplasmoses, para proporcionar una red de intercambio de conocimiento técnico y científico, y para la promoción y coordinación de investigaciones y desarrollo *in situ* de enfermedades micoplásmicas de rumiantes. De esta acción se esperaba que aportara rápidamente los elementos necesarios para la elaboración de estrategias para la prevención y erradicación de micoplasmosis de rumiantes. Descubrimientos sobre las relaciones filogenéticas entre las diferentes especies de micoplasmas involucrados en micoplasmosis de rumiantes, revelaron la dificultad de diferenciar claramente algunos de ellos. Esto puso de manifiesto la urgencia de llevar a cabo más investigaciones básicas con este importante grupo de micoplasmas (Frey, 1998).

La técnica de PCR es considerada como uno de los métodos más rápidos y sensibles para la detección de patógenos infecciosos en especímenes clínicos. Esta técnica es particularmente útil para la detección y diferenciación de miembros del grupo *M. mycoides*, los cuales son de difícil o imposible diferenciación usando los métodos tradicionales de cultivo y técnica serológicas (Nicholas y cols., 2008).

Debido a que la región 16S por sí sola no basta para poder diferenciar a micoplasmas en general (Pettersson y cols., 1996) y a los componentes del grupo *M. mycoides* en especial (Manso-Silván y cols., 2011) y a que la ISR en ciertos micoplasmas tampoco es capaz de discriminar entre ellos (Harasawa y cols., 2000), se hace necesario estudiar otras regiones del genoma. Por ello se decidió analizar la región que codifica el gen del ARNr 23S, ya que es una herramienta útil como marcador filogenético en las relaciones evolutivas entre las especies de

micoplasma (Fischer y cols., 2012). Las secuencias del gen 23S ARNr presentan regiones universales, conservativas y variables, al igual que en el gen ARNr 16S, pero al tener un mayor número de nucleótidos, quedaría por ver si las regiones variables entre los micoplasmas aislados de rumiantes son lo suficientemente discriminativas para poder servir de base para el diseño de cebadores específicos que puedan ser utilizados en el diagnóstico de las micoplasmosis producidas por micoplasmas del grupo *M. mycoides*.

La problemática de la resistencia de microorganismos a antibióticos puede atribuirse al incremento del uso de ellos y a la propagación de bacterias resistentes. Esta resistencia puede estar condicionada por una característica intrínseca o ser el resultado de la presión selectiva por el uso de antimicrobianos. El tratamiento contra micoplasmas se ve complicado ya que, la carencia de pared celular en los micoplasmas hace que sean resistentes a antimicrobianos cuya diana sea esta estructura, como los beta-lactámicos y glucopéptidos. Además, tampoco tienen efecto sobre estos microorganismos otros antimicrobianos con distintos mecanismos de acción, como, por ejemplo: las polimixinas, rifampicinas y sulfonamidas (Bébéar, 1996; Bébéar y Pereyre, 2005). El control de los micoplasmas se realiza mediante vacunación y antibioterapia, siendo los antimicrobianos más frecuentemente utilizados las quinolonas, macrólidos y tetraciclinas. Varios factores deben ser considerados en el tratamiento con antimicrobianos, tales como la selección de los mismos, los períodos de suspensión más adecuados para evitar residuos en la leche y la carne, y el posible desarrollo de resistencia a dichos antimicrobianos. Muchos de estos antibióticos sistémicos como los macrólidos, suprimen el crecimiento bacteriano inhibiendo la función de sus ribosomas, en donde se pueden encontrar mutaciones puntuales, especialmente

en el ARNr 23S, que confieren resistencia intrínseca. La problemática de la resistencia a antibióticos fomenta la búsqueda de nuevos antimicrobianos.

Los micoplasmas se consideran que son hospedadores específicos, aunque se han descrito infecciones cruzadas con hospedadores relacionados (Brown y cols., 2010b). Se ha sugerido la posibilidad de que los dromedarios puedan ser reservorios de micoplasmas patógenos de rumiantes, si bien en un estudio realizado en la isla de Lanzarote no se encontraron evidencias serológicas de Mmc ni de *M. agalactiae* (De la Fe y cols., 2009).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se presentan los objetivos de la presente Tesis Doctoral:

1. Estudio del gen del ARNr 23S y de las regiones intergénicas 16S-23S y 23S-5S de las cepas tipo de micoplasmas del grupo *M. mycoides* y micoplasma relacionados.
2. Valoración del uso de la región intergénica 16S-23S del ARNr como potencial diana genética para su aplicación a la técnica DGGE.
3. Selección *in vitro* de cepas resistentes a eritromicina a partir de cepas sensibles de *M. mycoides* subsp. *mycoides* y *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*.
4. Caracterización de mecanismos responsables de resistencia en los mutantes seleccionados *in vitro*.
5. Determinación de la efectividad *in vitro* de extractos de *Artemisia vulgaris* L. como antimicrobiano frente a cepas de especies del grupo *M. mycoides* y otras filogenéticamente cercanas.

6. Valoración de la sensibilidad a macrólidos en cepas de colección de especies pertenecientes al grupo *M. mycoides* y otras especies filogenéticamente cercanas a dicho grupo.
7. Valoración del papel de los dromedarios como reservorios de micoplasmas del grupo *M. mycoides*.
8. Identificación de una nueva especie de micoplasma aislada de vagina de dromedaria.

## 1.2. Revisión bibliográfica

### 1.2.1. Taxonomía y Filogenia de los Mollicutes

Los micoplasmas son los seres con capacidad de auto-replicación más pequeños que se conocen. Se distinguen fenotípicamente de las restantes bacterias por su pequeño tamaño y la ausencia de una pared celular rígida. Esta ausencia de pared queda reflejada en la nomenclatura de la clase a la que pertenecen, *C/Mollicutes* (del latín “mollis”: suave; “cutis”: piel), cuyo status taxonómico fue propuesto por Edward y Freunt (1967). Los microorganismos de dicha clase están relacionados filogenéticamente con bacterias Gram-positivas de la división *Firmicutes*, compartiendo con ella su origen filogenético (Woose y cols., 1980; Weisburg y cols., 1989), aunque actualmente se encuentran clasificadas como la única clase de la división *Tenericutes* (Brown y cols., 2010b).

El término micoplasma se solía emplear como sinónimo de microorganismos de la clase *Mollicutes*, pero actualmente se está promoviendo su uso para referirse exclusivamente a los miembros del género *Mycoplasma* (*M.*). Por este motivo al referirnos coloquialmente a microorganismos de la clase *Mollicutes*, utilizaremos el término mollicutes, mientras que

utilizaremos los términos micoplasma, acoleplasma, ureaplasma... cuando se quiera hacer mención del género en cuestión. Por otro lado, aunque actualmente el micoplasma anteriormente conocido como *M. mycoides* subsp. *mycoides* tipo LC, se encuentra englobado dentro de la subespecie *M. mycoides* subsp. *capri* (Manso-Silván y cols., 2009), en este estudio se sigue haciendo referencia a dicho micoplasmas con su nomenclatura original, así como en el caso de *M. mycoides* subsp. *mycoides* tipo SC.

Desde principios del siglo XX y hasta los años 30, se les consideró virus, ya que podían atravesar filtros porosos que impedían el paso de otras bacterias. Posteriormente, se sugirió que los micoplasmas podrían estar clasificados entre los virus y las bacterias, aunque no se ha encontrado razón de peso para ello. Sin embargo, sí existen claras diferencias con bacterias y virus, que justifican su clasificación diferenciada (**Tabla 1.1**).

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

**Tabla 1.1.** Diferencias entre mollicutes, bacterias y virus (Howard y Gourlay, 1978).

La clasificación y determinación de la historia evolutiva de los microorganismos se basa en su estudio, siendo la presencia o ausencia y el carácter de la pared celular uno de los primeros indicadores para determinar su taxonomía. Pero debido a la gran aportación filogenética, basada principalmente en el estudio del gen ARNr 16S, se impuso un nuevo enfoque de clasificación al margen de la tipificación funcional o morfo-estructural. Como efecto a este nuevo enfoque se

incluyó a la clase *Mollicutes* dentro de la división *Firmicutes* (aunque momentáneamente) (Garrity y cols., 2007; Oshima y cols., 2013).

La filogenia de los micoplasmas fue esclarecida mediante el análisis secuencial del ARN ribosómico 16S (Woose y cols. 1980). Todo organismo con auto-replicación posee ribosomas, de ahí que sea posible utilizar la secuencia de la subunidad 16S ARNr para construir árboles filogenéticos universales. En los mollicutes se ha encontrado que forman un grupo de organismos coherente relacionados en su origen evolutivo con los clostridios (bacterias gram positivas) pero con una elevada tasa de mutaciones (Woose y cols. 1980; Olsen y Woose, 1993; Johansson y Pettersson, 2002). No obstante, el uso de marcadores filogenéticos alternativos, tales como la subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa, la chaperonina GroEL, la aminoacil ARNt sintetasa y las subunidades FOF1-ATPasa (Ludwig y Schleifer, 2005; Ludwig y cols., 2009), junto al característico hecho de carecer de pared celular, parece defender la separación definitiva de los *Mollicutes* a la división *Tenericutes* (Brown y cols., 2010b).

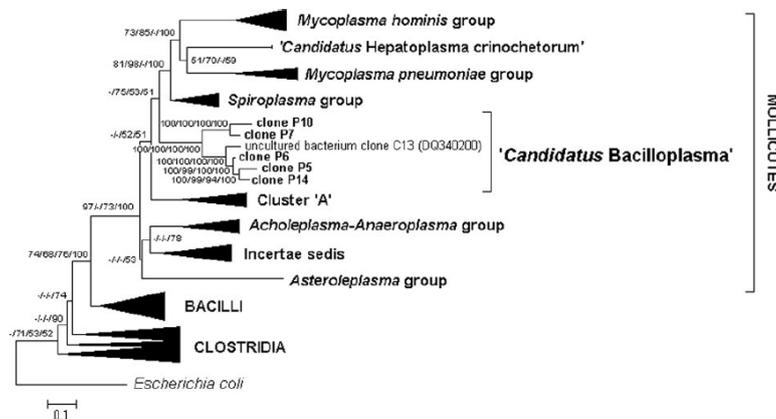
De esta manera en el Manual Bergey vol. 4 se alberga la siguiente clasificación para la clase *Mollicutes*, la única clase de la división *Tenericutes*, basada en lo propuesto por Brown y cols. (2010b), en la cual además se incluyen aquellos *Mollicutes* que actualmente son incultivables (Phytoplasmas y haemoplasmas) (**Tabla 1.2**).

Orden	Familia	Género
I. <i>Mycoplasmales</i>	<i>Mycoplasmataceae</i>	<i>Mycoplasma</i>
		<i>Ureaplasma</i>
	<i>Incertidae sedis</i>	<i>Eperythrozoon</i>
		<i>Haemobartonella</i>
II. <i>Entomoplasmales</i>	<i>Entomoplasmataceae</i>	<i>Entomoplasma</i>
		<i>Mesoplasma</i>
	<i>Spiroplasmataceae</i>	<i>Spiroplasma</i>
III. <i>Acholeplasmatales</i>	<i>Acholeplasmataceae</i>	<i>Acholeplasma</i>
	<i>Incertidae sedis</i>	" <i>Candidatus Phytoplasma</i> "
IV. <i>Anaeroplasmatales</i>	<i>Anaeroplasmataceae</i>	<i>Anaeroplasma</i>
		<i>Asteroleplasma</i>

**Tabla 1.2.** Taxonomía de la Clase *Mollicutes*. Adaptado de Brown y cols. (2010b).

La subdivisión en familias se basa en el hábitat, los requerimientos metabólicos de esteroides, la tolerancia al oxígeno y las características morfológicas como el tamaño del genoma (Razin y Freundt, 1984). Así podemos definir a los *Mollicutes* como un grupo heterogéneo, con un tamaño medio de 200 a 500 nanómetros de diámetro, caracterizados por la ausencia de pared celular, incapacidad para sintetizar peptidoglicano o sus precursores, (lo que les confiere resistencia a los antibióticos beta-lactámicos) y requerimiento de esteroides y ácidos grasos en la mayoría de las especies cultivables. Weisburg y cols. (1989) propusieron cinco grupos filogenéticos donde se distribuyen los miembros de la C/ *Mollicutes*. Estos grupos están compuestos por: anaeroplasma, asteroleplasma, spiroplasma, pneumoniae y hominis. A *posteriori*, se ha propuesto el género *Hepatoplasma* (*Mollicutes*, *Mycoplasmales*) a partir de "*Candidatus Hepatoplasma crinochetorum*" un simbiote encontrado en ocho especies de isópodos terrestres (Wang y cols., 2004) y al "*Candidatus Bacilloplasma*" También detectado en

isópodos (Kostanjšek y cols., 2007) y que muy posiblemente formarán parte de nuevos grupos filogenéticos (figura 1.1).



**Figura 1.1.** Agrupación filogenética de la Clase *Mollicutes* incluyendo *Candidatus Hepatoplasma crinochetorum* y *Candidatus Bacilloplasma*.

### 1.2.2. Características generales

Los *Mollicutes* son considerados como los organismos replicantes de forma autónoma más pequeños, pero visibles al microscopio óptico. Su reducida carga génica está directamente relacionada con un menor número de genes respecto de otras bacterias, lo que condiciona un reducido rango de proteínas que pueden ser sintetizadas por estos microorganismos (Razin y Freundt, 1984; Razin y cols., 1998). La incapacidad de sintetizar peptidoglicano es lo que origina la ausencia característica de pared celular, lo cual explica muchas de las propiedades únicas de los micoplasmas, como la sensibilidad al choque osmótico y detergentes, resistencia a la penicilina y la formación, en medio sólido, de colonias peculiares con forma de “huevo frito” (Razin y Hayflick, 2010).

Aunque los micoplasmas descienden de microorganismos con características de tinción Gram positivos como *Clostridium* y *Erysipelothrix*, al carecer de pared bacteriana, han sido

considerados como Gram negativos, presentando únicamente tinción positiva al Giemsa (Howard y Gourlay, 1978). Sin embargo, los micoplasmas mantienen algunas características de éstos, como un contenido Guanina + Citosina muy bajo, que está entre 23-34%, nunca superior al 41% de *Mycoplasma pneumoniae*. El tamaño de su genoma oscila entre 580 a 2200 kpb, y, por tanto, ello limita la cantidad de proteínas que son capaces de sintetizar, además de las vías metabólicas y enzimáticas que pueden utilizar (Razin y cols., 1998). En oposición a otras bacterias, la mayoría de los *Mollicutes* presentan tan sólo una o dos copias de los genes ARNr (aunque algunas especies de *Mesoplasmas* presentan hasta tres copias). El ARNr 5S es sensiblemente menor en número de nucleótidos, y el número de genes ARNr es reducido. La ARN polimerasa es resistente a la rifampicina, y en algunos géneros (incluido el G/ *Mycoplasma*), se observa una característica distintiva en el uso del codón UGA, que codifica para el aminoácido triptófano, siendo un codón de parada (stop) de la traducción en la mayor parte de eucariotas y procariotas.

Estos microorganismos no poseen citocromos o el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, a excepción de la actividad de la enzima malato deshidrogenasa. También carecen de los genes que codifican a los precursores de ácidos nucleicos y, aparentemente no sintetizan pirimidinas o purinas de novo. Todas estas características hacen de los micoplasmas unos microorganismos muy dependientes del entorno (Pollack y cols. 1997).

En la caracterización de nuevas especies, una de las condiciones requeridas era la aportación de antisueros específicos y pruebas de inhibición frente a antisueros de todas las especies reconocidas. Esto es debido a que los *Mollicutes* en pruebas de inhibición de crecimiento son sensibles a la lisis por anticuerpos específicos sin la mediación del complemento.

No obstante, el estudio del gen ARNr 16S es actualmente una prueba obligatoria (Brown y cols., 2007), limitando el número de especies frente a las que realizar dichas pruebas serológicas, incluso llegando a ser incluso, totalmente prescindibles (Firrao y Brown, 2013).

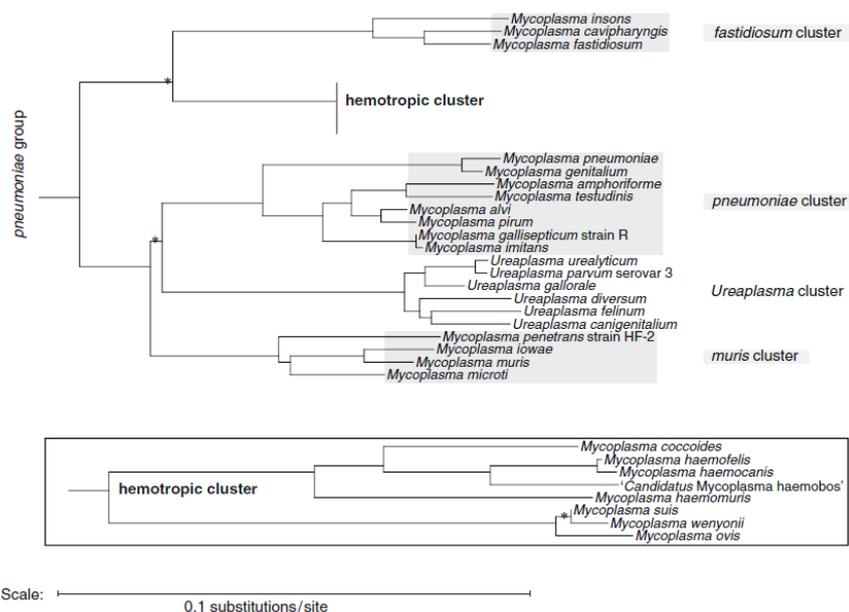
Filogenéticamente, los *Mollicutes* han sido objeto de controversia durante años dada su relativa simplicidad genética y fenotípica, respecto de otras bacterias. Las primeras hipótesis sobre la evolución de estos microorganismos apuntaron hacia la evolución desde un ancestro primitivo independiente. No obstante, previo a los estudios sobre el gen ARNr 16S, Neimark (1979) identificó enzimas características compartidas por estreptococos, bacterias ácido-lácticas y *Mollicutes*. El trabajo de Woose y cols. (1980), apunta a una “evolución reductiva” que parte desde una rama antigua del linaje clostridial.

Todos los *Mollicutes* actúan como comensales o bien como parásitos, y se distribuyen en un amplio rango de hospedadores, incluyendo vertebrados, insectos y plantas. Muchos de ellos pueden considerarse patógenos de gran impacto en seres humanos, animales, plantas y otros seres vivos (Razin, 1992). La reducida capacidad metabólica y enzimática de los *Mollicutes* parece justificar la dependencia nutricional tan acusada de estos microorganismos y su parasitismo.

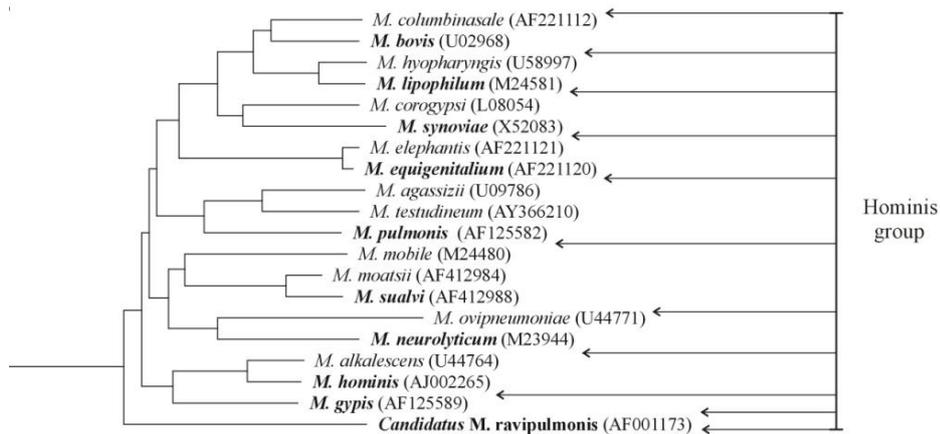
Dentro de la clase *Mollicutes*, el género donde encontramos el mayor número de especies reconocidas es el correspondiente al G/ *Mycoplasma*, con 117 especies, sin incluir 14 especies más pendientes de clasificación (Brown y cols. 2010a) y cuyo número aumenta cada año con la descripción de nuevas especies (*Mycoplasma mucosicanis*- Spergser y cols., 2011; *Mycoplasma haemolamae*- Crosse y cols., 2012; *Mycoplasma neophronis*- Suárez-Pérez y cols., 2012; *Mycoplasma feriruminatoris*- Jores y cols., 2013; *Mycoplasma ciconiae* (Möller Palau-Ribes y cols.,

2016). Dentro de las especies reconocidas, muchas son consideradas patógenas para humanos, animales de producción y animales silvestres.

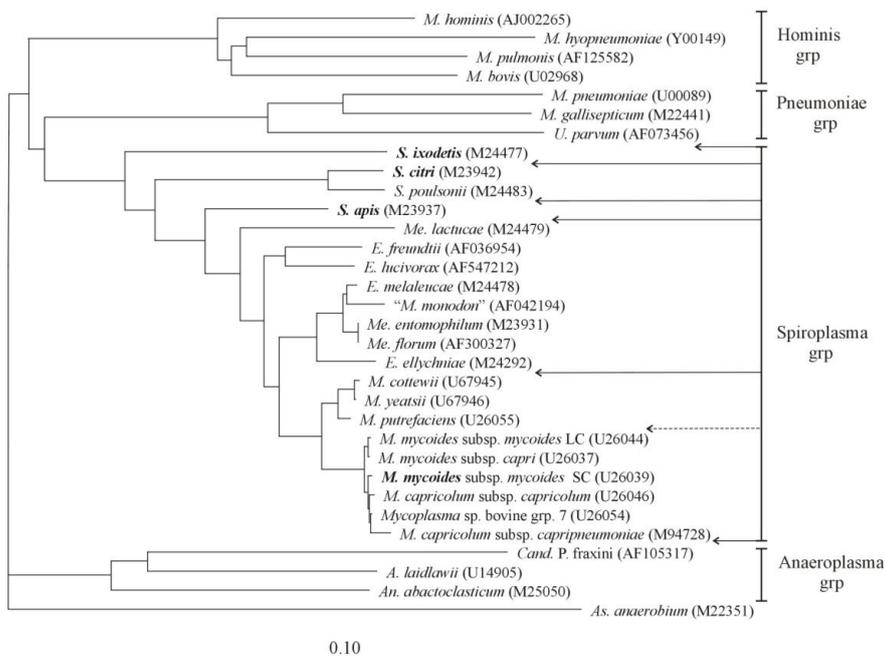
En base a la clasificación filogenética, el género *Mycoplasma* se encuentra repartido por tres de los cinco grupos filogenéticos de mollicutes: grupo *hominis* con 8 clústeres (*M. equigenitalium*, *M. bovis*, *M. lipophilum*, *M. synoviae*, *M. hominis*, *M. pulmonis*, *M. suis* y *M. neurolyticum*), grupo *pneumoniae* con 5 clústeres (*M. fastidiosum*, *hemotrópico*, *M. pneumoniae*, *M. muris*, y *Ureaplasma*) (Johansson y Pettersson, 2002) y grupo *Spiroplasma* (Brown y cols., 2010c) (figura 1.2, 1.3 y 1.4).



**Figura 1.2.** Clasificación taxonómica del género *Mycoplasma* (grupo *pneumoniae*), obtenido del Manual Bergey, vol.4, (Brown y cols., 2010a).



**Figura 1.3.** Clasificación taxonómica del género *Mycoplasma* (grupo *hominis*) (Cortesía de Karl-Eric Johansson).



**Figura 1.4.** Clasificación taxonómica del género *Mycoplasma* (grupo *spiroplasma*) (Cortesía de Karl-Eric Johansson).

### 1.2.3. Ultraestructura

Aunque las formas visibles más pequeñas tienen aproximadamente 300nm, al ser muy flexibles, pueden atravesar, forzados o no, filtros entre 220 y 450 nm, los cuales retendrían organismos de dimensiones similares con pared rígida. Y aunque ciertos micoplasmas son móviles, no poseen flagelos ni microvellosidades. En general, presentan una morfología de forma cocoidea o pleomórfica, si bien los espiroplasmas pueden también presentar una morfología celular en espiral cuando están en crecimiento de la fase exponencial en medio líquido (Poveda y cols., 2002; Brown y cols., 2010b).

El proceso de división celular de los micoplasmas se lleva a cabo por fisión binaria, aunque como la división citoplasmática puede retrasarse con respecto a la replicación del genoma, se podrían formar durante un tiempo filamentos multinucleados (Razin y Hayflick, 2010).

Su ultraestructura está compuesta por: membrana plasmática, molécula bicatenaria circular de ADN (típico genoma procariota), moléculas de ARN, ribosomas y gránulos citoplasmáticos. Los micoplasmas no presentan orgánulos subcelulares organizados, como mitocondrias, ni tampoco membranas intra-citoplasmáticas, por lo que los mollicutes presentan solamente un tipo de membrana. La membrana plasmática presenta un perfil trilaminar y está compuesta por dos tercios de proteínas y un tercio de lípidos. Y a diferencia de las membranas bacterias, su membrana contiene colesterol y carece de ácido diaminopimélico, lo que hace a la membrana de los mollicutes similar a la de las células eucariotas. Al no tener pared celular necesitan vivir en un entorno de elevada presión osmótica para permitir la isotonía con respecto al medio interior (Poveda y cols., 2002; Razin y Hayflick, 2010).

Debido a la imposibilidad de los micoplasmas en cuanto a la síntesis de una pared celular, se observa la carencia de un espacio periplásmico, y de una membrana externa para la distribución de las proteínas necesarias para cerrar sus superficies celulares. No obstante, la presencia de una membrana plasmática flexible de naturaleza trilaminar, representa una barrera única entre el interior citoplasmático y el medio externo. Dicha membrana está compuesta mayoritariamente por lípidos y proteínas, mientras que en menor grado la constituyen carbohidratos complejos en forma de glicoproteínas y glicolípidos (Kahane y Tully, 1976; Rottem y Kahane, 1993). Esta membrana contribuye al éxito de los micoplasmas en la adaptación a un amplio rango de hospedadores, y en el establecimiento de enfermedades de naturaleza crónica (Rottem, 2003, Citti y cols., 2010), ya que a pesar de su simplicidad (con un peso aproximado al 10% de la membrana citoplasmática de *E. coli*), es capaz de mantener un diseño versátil tanto antigénica como funcionalmente.

Las proteínas de membrana asociadas a lípidos (LAMPs) de algunos micoplasmas tales como *M. fermentans*, han mostrado alta antigenicidad y efecto citotóxico contra las células linfocíticas y monocíticas (Into y cols., 2002), además de capacidad para inducir la diferenciación y apoptosis en líneas celulares leucémicas (Hall y cols., 2000). De ello se deduce que cabría la posibilidad de emplear las LAMPs como agentes terapéuticos contra la leucemia, o bien como agentes inmunomoduladores en procesos cancerosos (You y cols., 2006).

En estrecha relación con la membrana celular se presenta la matriz extracelular fibrilar o cápsula (Wilson y Collier, 1976; Minion y Rosenbush, 1993). Esta cápsula ha sido documentada en varias especies de los géneros *Mycoplasma* y *Ureaplasma*, entre las que se encuentran *M.*

*mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony, *M. dispar*, *M. gallisepticum*, *M. hominis*, *M. hyopneumoniae*, *M. meleagridis*, *M. pneumoniae*, *M. pulmonis*, *M. synoviae*, *M. capricolum* subsp. *capricolum* y *Ureaplasma urealyticum* (Boatman y Kenny, 1971; Robertson y Smook, 1976; Rurangirwa y col., 1987).

#### **1.2.4. Requerimientos orgánicos**

Los micoplasmas presentan un ciclo del ácido tricarboxílico incompleto, y carecen de quinonas o citocromos, lo que impide el proceso de fosforilación oxidativa (Miles, 1992a y b). Generalmente emplean azúcares o arginina como principal fuente de energía (aunque algunas especies como *M. capricolum* subs. *capricolum* pueden emplear ambas, o bien ninguna de las anteriores, como en el caso de *M. bovis*, que emplea piruvato y ácidos orgánicos) (Poveda y cols., 2002).

Estos microorganismos se multiplican en medios líquidos, donde apenas puede apreciarse un ligero enturbiamiento, siendo en los medios sólidos donde se evidencia dicho crecimiento (Poveda y cols., 2002). Para conseguir que se multipliquen en medios artificiales se necesitan medios de cierta complejidad, ya que se trata de organismos dependientes del colesterol (el cual se aporta con el suero de diferentes especies animales) y precursores de ácidos nucleicos, todo ello debido a la gran necesidad nutricional y metabólica que presentan los micoplasmas (Razin, 1974). No obstante, se ha demostrado la eficacia de un medio semi-definido elaborado sin suero, para el crecimiento de micoplasmas caprinos (Ramírez y cols., 2008b).

Además, estas bacterias precisan de un estrecho contacto con las células del hospedador para obtener los nutrientes que necesitan. Para ello se de estructuras u orgánulos especializados

de ensamblaje, como en el caso de *M. pneumoniae* y *M. mobile* (Balish, 2006; Balish y Krause, 2006), o únicamente por proteínas variables de superficie (*M. synoviae* y *M. pulmonis*). Por otra parte, existen micoplasmas con la capacidad de invadir y penetrar parcialmente las células del hospedador, como en el caso de *M. penetrans* (Lo y cols., 1992), mientras que micoplasmas altamente patógenos, como *M. alligatoris*, podrían emplear una combinación de hialuroidasa y sialidasa en detrimento de las adhesinas (Brown y cols., 2004). Como consecuencia de la adherencia a las células eucariotas, aquellos productos tóxicos del metabolismo de los micoplasmas, como peróxido de hidrógeno y radicales superóxido, generan daño oxidativo sobre las membranas de las células del hospedador (Razin, 1991).

Al cultivar gran cantidad de bacterias es necesario incluir una solución tampón a los cultivos. Los valores de pH necesarios para el crecimiento de los micoplasmas oscilan entre 6 y 8. Valores de pH inferiores a este pueden conllevar a un descenso en la curva de crecimiento y a una posible muerte celular. En el caso de los micoplasmas no fermentativos, como aquellos que utilizan la arginina o la urea, se corre el riesgo de que el valor de pH se vea aumentado en exceso, con un resultado similar (Rodwell y Mitchell, 1979; Rodwell, 1983).

#### **1.2.5. Factores biofísicos que inciden en el crecimiento**

Algunos factores biofísicos que afectan al crecimiento bacteriano están controlados por los componentes de los medios de cultivo (pH, actividad del agua y presión osmótica) y otros, por el ambiente externo (temperatura, oxígeno y presión), mientras otros factores como el potencial de oxidación-reducción, están controlados por ambos (Costilow, 1980).

El intervalo de pH, medida de la actividad del ion hidrógeno ( $H^+$ ), ideal para el crecimiento de los mollicutes es (como se comentó anteriormente) cercano a la neutralidad (pH=7.0) (Costilow, 1980). Miles (1983) encontró que este factor es el que más afecta a la viabilidad de los micoplasmas en un medio.

Debido a la ausencia de pared celular, los medios empleados para su cultivo deben tener Debido a la ausencia de pared celular, los medios empleados para su cultivo deben tener el nivel adecuado de proteínas para conseguir la osmolaridad necesaria. La presión osmótica máxima tolerada por los micoplasmas se encuentra en el intervalo de 12-14 atmósferas, siendo el intervalo de presión osmótica en el que mejor crecen entre 10-14 atmósferas (Ramírez, 1999).

A excepción de los *Anaeroplasmas*, los cuales son anaerobios estrictos, el resto de micoplasmas son aerobios o anaerobios facultativos, por lo que se pueden incubar aeróbicamente. El empleo de una atmósfera enriquecida con  $CO_2$  (entre el 5 y el 10%) facilita su aislamiento y replicación. Además, para evitar que las placas de medio sólido se deshidraten, su incubación se lleva a cabo en ambiente húmedo.

La temperatura de incubación es un factor que afecta a la tasa de crecimiento de todas las bacterias, ya que afecta a todas las reacciones celulares. De forma genérica la temperatura óptima para el cultivo de micoplasmas se sitúa entre los 36-38°C (Poveda y cols., 2002), mientras que los espiroplasmas tienen un crecimiento más óptimo a 30-32°C y *M. mobile* lo hace a 25°C (Kirchhhoff y Rosengaten, 1984).

#### **1.2.6. Resistencia a los agentes físico-químicos**

En general, los micoplasmas son resistentes a todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, cuyo mecanismo de acción actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular. También son resistentes a las lisozimas. Por otra parte, son sensibles a la lisis por choque osmótico, calor, detergentes, alcoholes, antisépticos, ultrasonido y anticuerpos específicos fijadores de complemento. Los antibióticos más activos contra estos microorganismos son los macrólidos, tetraciclinas, quinolonas y cloranfenicol (Ramírez, 1999).

Los micoplasmas presentan una débil resistencia a las altas temperaturas, aunque esta resistencia varía dependiendo del medio en que se encuentren. Por otro lado, el frío es un conservador excelente y los organismos pueden sobrevivir largos periodos de tiempo, especialmente cuando al cultivo se le añaden soluciones crioprotectoras (suero de caballo), que además sean ricas en nutrientes, tales como inositol y otros azúcares (Ramírez, 1999). Las mejores temperaturas para conservar los micoplasmas son las inferiores a  $-30^{\circ}\text{C}$  (Poveda y cols., 2002).

#### **1.2.7. Hábitat**

Estos microorganismos presentan unas características fenotípicas y genómicas muy diversas, así como amplio rango de hospedadores naturales. En general los micoplasmas están diseminados en toda la naturaleza pudiendo encontrarse en mamíferos, aves, reptiles, peces, artrópodos y plantas, ya sea como comensales, patógenos o patógenos oportunistas (Razin, 1978; Weisburg y cols., 1989).

Dada su estrecha relación con el hospedador, sus propiedades biológicas tienden a reflejar esta afinidad, lo que implica especificidades nutricionales muy selectivas. Los lugares donde podemos encontrarlos con mayor asiduidad son sobre todo en las mucosas, ya sea del tracto respiratorio, digestivo, urogenital u ocular, así como en las glándulas mamarias y en las articulaciones (Razin, 1978; Weisburg y cols., 1989; Razin y cols., 1998).

Aunque los mollicutes se caracterizan por una elevada especificidad de hospedador y tejido, existen bastantes descripciones de micoplasmas aislados fuera de su hospedador y tejidos habituales (Razin y cols., 1998).

Entre un 15 y un 30% de las líneas celulares bien establecidas están contaminadas con micoplasmas (Uphoff y Drexler, 2002b), lo que hace de estos microorganismos uno de los contaminantes más comunes y relevantes de las líneas celulares eucariotas (Drexler y Uphoff, 2002a). Una gran parte de las contaminaciones son debidas a *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. hominis*, *M. orale* y *M. hyorihinis*, y en menor grado a *M. pirum* y *M. salivarum*, aunque algunas especies del género *Mycoplasma* y otros representantes de la clase *Mollicutes* como *Acholeplasma laidlawii* han podido ser aislados desde líneas celulares contaminadas (Uphoff y Drexler, 2002a). Muchas líneas de investigación dedican gran esfuerzo al desarrollo de técnicas de identificación diagnóstica basadas en PCR, para microorganismos de la clase *Mollicutes* o del género *Mycoplasma*, (Van Kuppeveld y cols., 1992; Kong y cols., 2001; Sung y cols., 2006), ya que el control y erradicación de los micoplasmas de los cultivos de líneas celulares se considera poco fiable (Del Giudice y Gardella, 1996). No obstante, la eliminación mediante protocolos de

tratamiento a base de fluoroquinolonas, macrólidos y tetraciclinas han mostrado un mayor éxito (Uphoff y Drexler, 2011).

Dentro de las especies tipificadas del género *Mycoplasma*, aproximadamente la mitad de éstas no ocasionan un cuadro clínico o enfermedad aparente en el hospedador en el que se presentan. No obstante, la gran mayoría de las especies pueden actuar como patógenos oportunistas o patógenos secundarios (Baseman y Tully, 1997). Las especies que han sido estudiadas en mayor profundidad son aquellas que se identifican como patógenos primarios en humanos y animales domésticos.

#### **1.2.8. Identificación y caracterización**

Previo a la caracterización de los *Mollicutes* es necesario llevar a cabo la identificación de los mismos, para lo cual es necesaria la obtención de cultivos puros. Ello se consigue mediante la siembra en medio sólido adecuado desde diluciones seriadas del cultivo en medio líquido, el cual previamente debe haber sido pasado a través de filtros de un diámetro comprendido entre 0.22 y 0.45  $\mu\text{m}$ , pudiendo de esta manera tomar aquellas colonias que crezcan de forma aislada y pasarlas a medio líquido adecuado para su crecimiento en estufa a 37°C (o a la temperatura más adecuada), para poder repetir el mismo protocolo al menos tres veces consecutivas. Con la clonación nos aseguramos que trabajamos con una única especie (Tully, 1983).

En cuanto a la morfología de las colonias de *Mollicutes*, éstas muestran en su gran mayoría una típica forma de “huevo frito”, como ya se comentó anteriormente, la cual posee una zona periférica más translúcida, y una zona central más opaca debida seguramente a la actividad proteolítica. Para el género *Ureaplasma* nos encontramos con colonias que no presentan zona

periférica, sino que se presentan colonias totalmente opacas en medios de cloruro de calcio o de manganeso. Sin embargo, cuando las condiciones de cultivo no son las óptimas se llega a observar colonias sin zona periférica o sin zona central (Taylor-Robinson, 1989).

Los factores que influyen en el tamaño y forma de las colonias pueden ser: la composición e hidratación de los medios utilizados, las condiciones atmosféricas, la densidad del cultivo y la edad del mismo. Aquellos *Mollicutes* de crecimiento rápido en medio sólido presentaran colonias de mayor tamaño en relación a aquellos de crecimiento más lento. El tamaño de las colonias viene determinando genéticamente y varía entre 15  $\mu\text{m}$  y 2mm de diámetro (Rosenbusch y Minion, 1992).

#### **1.2.8.1. Requerimiento en esteroides**

Uno de los métodos de identificación de *Mollicutes* es en función del requerimiento de esteroides, ya que con el podemos separar grupos taxonómicos muy cercanos entre sí. Así, el orden *Mycoplasmatales* y los géneros *Entomoplasma* y *Anaeroplasma* son dependientes de esteroides, mientras que el orden *Acholeplasmatales* y los géneros *Mesoplasma* y *Asteroleplasma* no lo son. La forma más sencilla de comprobación es someter al cultivo a un medio desprovisto de esteroides y comprobar si existe o no crecimiento, obteniéndose, además, una cuantificación de los requerimientos de esteroides mediante el uso de medios con diferentes concentraciones en colesterol (Tully, 1983).

#### **1.2.8.2. Métodos bioquímicos y enzimáticos**

Dichos métodos poseen una importancia relativamente alta para la diferenciación taxonómica básica, así como a nivel de familia y género (Poveda y Nicholas, 1998). No obstante,

se debe tener en cuenta que dichas técnicas no son cuantitativas y su interpretación en ocasiones puede llegar a ser imprecisa, en especial en aquellos cultivos con una baja densidad celular o en caso de que los medios utilizados posean muchos sustratos alternativos (Miles y Agbanyim, 1998). Dentro de los métodos bioquímicos y enzimáticos de diferenciación taxonómica encontramos:

#### **1.2.8.2.1. Fermentación de la glucosa**

Se puede hacer una división de los *Mollicutes* en función de su capacidad para metabolizar los azúcares, concretamente la glucosa, teniendo a fermentadores, aquellos capaces de metabolizar glucosa, y no fermentadores, como aquellos incapaces de metabolizar azúcares. Siendo ésta, además una prueba obligatoria en su caracterización (Razin y Cirillo, 1983). Aquellas especies fermentadores catalizan la glucosa u otros carbohidratos mediante la vía glicolítica hasta ácido láctico y algunas hasta ácido pirúvico, ácido acético y acetilmetilcarbinol (Taylor-Robinson, 1989).

Existen diferentes medios para comprobar la utilización de la glucosa por parte de los mollicutes, uno de ellos es mediante la medición del descenso del pH del medio de cultivo (Aluotto y cols., 1970), añadiendo un 1% de glucosa al medio de cultivo líquido y un indicador de pH (rojo fenol al 0.005%) a un pH de 7.6. Un cambio de coloración del medio (de rojo a amarillo) nos indica el descenso del pH y la consecuente utilización por parte del cultivo de la glucosa. Es conveniente tener siempre un tubo control (testigo). Obteniéndose como reacción positiva un descenso del pH de 0.5 unidades. En el caso de especies de crecimiento lento, el pH puede descender debido a otros factores no asociados a la fermentación de la glucosa, ya que los

medios suelen poseer suero equino y extracto de levadura entre sus componentes, los cuales pueden descomponerse con el trascurso del tiempo acidificando el medio y obteniéndose un falso positivo. Para evitar esto, se deben utilizar medios sin extracto de levadura y con un 1% de fracción de suero de bovino en lugar de suero de caballo (Razin y Cirillo, 1983). Además, es recomendable que el medio base sea preparado con arginina descarboxilasa para eliminar las trazas de arginina (Freundt y cols., 1979).

Otras formas de comprobar la fermentación de azúcares es mediante la reacción de la glucosa-oxidasa (Edwar y Moore, 1975). Donde la enzima oxida el azúcar obteniéndose de esta reacción ácido glucurónico y peróxido de hidrógeno, el cual da lugar a radicales que reaccionan con la ortofenildiamina (compuesto cromógeno). Como resultado de esta reacción se obtiene un compuesto coloreado detectable por espectrofotometría, que nos indica la utilización de la glucosa (Huggett y Nixon, 1957).

También a través de la detección de la producción de metabolitos ácidos procedentes del metabolismo de la glucosa podemos clasificar a los mollicutes como fermentadores o no fermentadores. Entre los ácidos producidos encontramos el ácido láctico, el pirúvico y el acético (Tourtellote y Jacobs, 1960). La existencia de estos ácidos en el medio se demuestra mediante la utilización de glucosa radioactiva, con lo cual los ácidos se identificarán por medio de una columna de intercambio iónico tratado con cloruro de litio (Cirillo y Razin, 1973).

#### **1.2.8.2.2. Hidrólisis de la urea**

Observación directa de cambio de coloración por alcalinización de un medio de cultivo líquido suplementado con un 1% de urea. Cabe destacar que existen algunas especies del género

*Mycoplasma* capaces de hidrolizar la arginina, con lo que, sin poseer actividad sobre la urea, pueden provocar igualmente cambio de coloración del medio por alcalinización del mismo al producirse el metabolismo de pequeñas cantidades del aminoácido. Por ello es recomendable usar medios específicos en dicha prueba (Razin, 1983).

#### **1.2.8.2.3. Hidrólisis de la arginina**

Algunas especies del género *Mycoplasma* tienen capacidad hidrolítica, sean fermentadores de glucosa o no. En este proceso intervienen tres enzimas: arginina-deiminasa, ornitina-transcarbamilasa y carbamato-quinasa, y como productos se obtienen amoníaco, CO<sub>2</sub> y ATP (Barile, 1983). En función de la producción de amoníaco, se puede comprobar la acción hidrolítica de estas bacterias, midiendo el mismo a través de la alcalinización del medio de cultivo (Schimke y cols., 1966). Debemos tener en cuenta la posible interferencia del suero equino en los resultados, por lo que se deben emplear bajas concentraciones del mismo, o sustituirlo por suero bovino, evitando a su vez el efecto tampón que genera la presencia de grandes cantidades de suero (Barile, 1983).

Sin embargo, el protocolo de elección para la caracterización mediante hidrólisis de la arginina es el de la arginina-deiminasa, el cual consiste en el cambio de coloración que ocurre en el medio de cultivo por la formación de citrulina. El medio se encuentra a un pH de 6.5 y está suplementado con arginina, pasando de un tono amarillo-anaranjado a un todo morado por la formación de la citrulina. Este cambio es medido mediante espectrofotometría a una absorbancia de aproximadamente 490nm (Archibald, 1944; Poveda, 1998).

La clasificación del género *Mycoplasma* en arginina positivo y arginina negativo tiene actualmente importancia (Barile, 1983), ya que existe una categorización de los mismos en base a esta técnica (Schimke y Barile, 1963; Barile y Schimke, 1963; Barile y cols., 1966).

#### **1.2.8.2.4. Actividad de la fosfatasa**

Esta técnica suele utilizarse, acompañada de un conjunto de otras pruebas bioquímicas, en la caracterización de nuevas especies, con que se ve reducido el número de pruebas serológicas necesarias para identificar especies. Sin embargo, esta prueba, pese a estar presente en aproximadamente un tercio de las especies conocida del género *Mycoplasma* y a la facilidad que conlleva su observación mediante procedimientos relativamente simples, carece de valor práctico en la investigación de *Acholeplasmas*, a excepción de *A. laidlawii*, el cual posee la actividad fosfatásica de forma limitada (Williams y Wittler, 1971) y tampoco en cepas del género *Ureaplasma*, ya que son todas positivas (Black, 1973).

La acción que presentan la fosfatasa sobre el difosfato de fenolftaleína del medio de cultivo (Aluotto y cols., 1970), ayuda a determinar la actividad de esta, ya que la acción hidrolítica de la enzima hace que se produzca la liberación de fenolftaleína, lo cual vuelve el medio de un color rojo-violáceo a un pH comprendido entre 9 y 10, tras 7 días de incubación (Freundt y cols., 1979), pudiendo determinarse tanto en medio líquido como sólido. El suero de caballo y la levadura con la que son preparados los medios, pueden poseer actividad fosfatásica propia, por lo que es aconsejable que el medio sea calentado durante 1 hora a 60°C para evitar en lo medida de lo posible los falsos positivos por esta causa (Bradbury, 1983).

#### **1.2.8.2.5. Reducción del tetrazolium**

Esta prueba se basa en la capacidad de los micoplasmas de reducir el 2, 3, 5-trifenil-tetrazolium, el cual da una coloración roja característica, siendo de gran importancia en la identificación de *M. pneumoniae*. Podemos observar esta actividad añadiendo al medio de cultivo el 2, 3, 5-trifenil-tetrazolium a una concentración del 0.2%, cultivándose tanto en anaerobiosis como en aerobiosis durante unas dos semanas (Erno y Stipkovits, 1973). Se debe tener en cuenta que la densidad utilizada en los cultivos puede influir en los resultados (Senterfit, 1983), por ello este método ha sido adaptado para su uso en medio sólido, evitando las variaciones en función de la densidad del cultivo y la cantidad del inóculo, además de ser más rápido (Aluotto y col., 1970; Woods y Smith, 1972), con lo cual tras 3-4 horas de incubación podemos observar una variación en la coloración del medio, pasando de rosa a rojo-púrpura.

#### **1.2.8.2.6. Formación de películas y cristales**

Otra característica de algunos *Mollicutes* es la capacidad de formar, alrededor de las colonias en el medio de crecimiento, cristales, procedentes del depósito de sales de calcio y magnesio de los ácidos grasos, y películas de colesterol y fosfolípidos, derivados de la actividad lipolítica de los microorganismos. Edward describió por primera vez este fenómeno en 1953 al observarlo en un medio con un 20% de suero de caballo. Fabricant y Freundt (1967) observan este mismo fenómeno en medios enriquecidos con suero de cerdo y emulsión de huevo al 10%. La intensidad de la reacción depende del organismo en cuestión y de la composición del medio (Freundt, 1983).

### **1.2.8.3. Perfiles de proteínas totales**

Se basa en la obtención de perfiles característicos de proteínas que ayudan en el agrupamiento de aquellas cepas de objeto de estudio. El conjunto de proteínas celulares extraída se somete a electroforesis uni- o bidimensional en un gel de poliacrilamida que además contiene dodecilsulfato sódico (SDS), agente desnaturizante (Kerstens y cols., 1994).

### **1.2.8.4. Métodos serológicos**

#### **1.2.8.4.1. Inhibición del crecimiento**

Esta prueba está basada en una reacción antígeno-anticuerpo específica, la cual se realiza en medio sólido. Esta reacción se produce debido a la lisis del microorganismo sin mediación del complemento. Esta reacción puede ser observada mediante la medición de un halo de inhibición superior a 2 mm alrededor de un disco inerte impregnado con el antisuero capaz de inhibir el crecimiento del microorganismo (Poveda y Nicholas, 1998).

#### **1.2.8.4.2. Inhibición del metabolismo**

En aquellos organismos cuyo crecimiento en medio sólido no es adecuado podemos realizar una prueba de inhibición de crecimiento en medio líquido, alternativa al método anterior. Tiene su base en los cambios de pH ocurridos a partir de las sustancias resultantes del metabolismo de los microorganismos en medio líquido, a los cuales se le adicionan marcadores de color en función del cambio de pH que esperamos que ocurra (Poveda y Nicholas, 1998).

#### **1.2.8.4.3. Inmunofluorescencia**

Técnica empleada principalmente para la tipificación serológica de microorganismos obtenidos directamente desde un primer aislamiento. Este conjunto de métodos fue introducido

por Del Giudice y cols. (1967), siendo una de sus principales ventajas la capacidad de detectar e identificar especies diferentes desde un mismo aislamiento, con lo cual no se hace necesario el uso de cultivos puros. En adición, se trata de una serie de procedimientos mediante los cuales son identificados de forma secuencial y con facilidad un número relativo de micoplasmas en los cultivos de estudio. La detección de microorganismo que tengan una presencia mínima en la muestra se considera otra de las ventajas de estas técnicas, sumada a la posibilidad que brinda en la comprobación de la pureza de cultivos tras realizar clonajes (Gardella y cols., 1983).

El funcionamiento de esta técnica, de forma directa o indirecta, está basado en el marcado de las inmunoglobulinas específicas que se encuentran en el antisuero, mediante un fluorocromo del tipo isocianato de fluoresceína. Para este marcado o conjugación se debe realizar un fraccionamiento proteico mediante sales neutras o sistemas para la extracción de los anticuerpos del suero, además de una diálisis y conjugación con el fluorocromo (Poveda, 1998).

En la metodología directa es adicionada una cantidad baja de inmunoglobulinas marcadas sobre bloques de agar donde se encuentran las colonias de estudio, para a continuación proceder a su incubación y a varios lavados con tampón PBS. Posteriormente se colocan sobre un portaobjetos y se observan mediante un microscopio de epifluoresceína. Debe ser usado, en principio, un objetivo débil, para facilitar la localización de las colonias, y a continuación un objetivo apocromático de 40X (Freundt y cols., 1979).

En cuanto al procedimiento en la técnica indirecta, además de lo anteriormente mencionado, se precisa de un suero antiglobulinas de la especie de estudio, conjugado con el

fluorocromo. Este método se califica con mayor sensibilidad y especificidad que el directo (Rosendal y Black, 1972).

#### **1.2.8.5. Inmunohistoquímica**

Con este procedimiento y mediante la utilización de anticuerpos monoclonales y policlonales es posible la determinar la localización de microorganismos en tejidos afectados (Rodríguez y cols., 1998).

#### **1.2.8.6. Métodos de biología molecular**

##### **1.2.8.6.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Se trata de una técnica de biología molecular mediante la cual se obtienen, a partir de un fragmento de ADN mínimo, un gran número de copias del mismo. Para ello se deben emplear cebadores o primeros; pequeñas secuencias de ADN que limitan aquellas áreas del genoma a replicar unidas a las ADN polimerasas, enzimas con propiedad de replicar esos fragmentos. Para que estos fragmentos de ADN puedan ser replicados es necesaria la separación, replicación, por parte de las ADN polimerasas y nueva unión de las hebras de ADN en ciclos sucesivos de altas y bajas temperaturas alternas (Bartlett y Stirling, 2003). Una reacción en cadena de la polimerasa-PCR (*Polymerasa Chain Reaction*) se encuentra dividida en varias fases. Una fase de inicio en la cual se activa la ADN polimerasa, una fase de desnaturalización, donde las dobles cadenas de ADN se separan, seguido de una fase de alineamiento, en la cual los cebadores se unen a la cadena para realizar las copias de ADN en la fase de extensión o elongación, finalizando con la fase de elongación final, en la cual aquellas copias inconclusas son completadas (Biau, 1997).

#### **1.2.8.6.2. Secuenciación de ADN**

Mediante la secuenciación se trata de conocer el orden que presentan los nucleótidos en un oligonucleótido de ADN. Gracias al conjunto de métodos mediante los cuales se lleva a cabo esta técnica se ha podido avanzar en la investigación y desarrollo biológicos a nivel de taxonomía, filogenia, estudios poblaciones, heredabilidad de caracteres, entre otros.

Con origen en la década de los '70, la secuenciación ha sufrido a lo largo de los años un gran desarrollo, tratándose actualmente de una única técnica totalmente automatizada con secuenciadores automáticos que pueden analizar gran número de muestras en poco tiempo, lo que nos permite incluso la secuenciación de genomas completos de microorganismos, plantas y animales (Prescott y cols., 2004; Hall, 2007). Contando en la actualidad con una total base de datos a nivel genómico vía internet. En la *International Nucleotide Sequence Database Collaboration* se encuentran integradas aquellas secuencias de genomas determinadas en estudios genéticos, accesibles para cualquier investigador.

La caracterización y clasificación filogenética de los organismos es una de las aplicaciones de la secuenciación de los productos de PCR, encontrándose dentro de estos microorganismos a los mollicutes (Hopert y cols., 1993; Uphoff y Drexler, 2002b; McAuliffe y cols., 2003). La secuenciación del gen que codifica para el ARNr (ARN ribosómico) 16S es la más utilizada, tratándose de un gran instrumento para la caracterización taxonómica en bacterias, pudiéndose redefinir relaciones filogenéticas dependientes de pruebas metabólicas hasta el momento. Ello se consigue debido a que esta región engloba a su vez regiones altamente conservativas y otras muy variables que son usadas en la diferenciación de géneros y especies (Göbel y cols., 1987; Rodicio

y Mendoza, 2004). Con el estudio de este gen han podido ser detectadas e identificadas varias especies de bacterias (Deng y cols., 1992).

En cuanto a las células procariotas nos encontramos con que el *loci* del ADNr contiene los genes que codifican los tres tipos de subunidades estructurales de sus ribosomas: 16S, 23S y 5S. Dichos genes se encuentran separados entre sí por regiones de distinto tamaño y secuencia, en función del género y especie de la bacteria en cuestión. De entre las regiones que separan los genes, la ISR (*Intergenic Spacer Region*) situada entre los genes que codifican para el ARNr 16S y el 23S destaca por ser una de las que presenta mayor variabilidad, por lo cual en base a ella se han establecido relaciones filogenéticas entre microorganismos muy próximos entre sí, pudiéndose, además, amplificar dicha región a casi cualquier microorganismo con la ayuda de cebadores universal, ya que cuenta con la ventaja de situarse entre genes altamente conservativos (Rodicio y Mendoza, 2004). Esta región intergénica se ha utilizado en la identificación de mollicutes cuyos genes ARNr16S son muy similares, tales como *M. auris* y *M. alkalescens* los cuales poseen una similitud del 98% (Harasawa, 1996; Tang y cols., 2000; Volokhov y cols., 2006; Ramírez y cols., 2011; Rebelo y cols., 2011). No obstante, encontramos algunas especies de mollicutes donde el grado de similitud entre ellos es bastante elevado, siendo el caso de *M. canadense* y *M. arginini*, entre los cuales el porcentaje de similitud para el gen que codifica al ARNr 16S y la ISR es del 99% y del 96.9% respectivamente, siendo necesaria su identificación mediante la secuenciación del gen que codifica para el ARNr 23S (Hotzel y col., 2003; Ramírez y col., 2008a; 2012). Hoy día se trata de averiguar si la comparación entre diferentes especies mediante la región comprendida entre los genes que codifican al ARNr 23S y

5S podría aportar información de utilidad en la comparación entre especies (Ramírez y col., 2010).

#### **1.2.8.6.3. PCR a tiempo real**

Una variante de la PCR convencional es la PCR a tiempo real (*Real-time PCR*), de mayor sensibilidad y especificidad y, que, además, aporta información cuantitativa del ADN (Baczynska y cols., 2004; Dubosson y cols., 2004; Rebelo y cols., 2011). Dicha técnica consiste en el uso de un fluorocromo o sonda marcada con un fluoróforo que aumenta su emisión al acoplarse específicamente a los productos del ADN, con lo cual se puede medir su tasa de generación, obteniéndose de esta manera una cuantificación (Stirling, 2003).

#### **1.2.8.6.4. DGGE**

La Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* – DGGE) es una técnica de trazado molecular consistente en la separación de las cadenas complementarias de ADN bicatenario dependiendo de su punto de desnaturalización (McAuliffe y cols., 2003; 2005). En su origen, esta técnica, fue usada para la detección de mutaciones puntuales en las secuencias de ADN (Fischer y Lerman, 1983; Lerman y Beldjord, 1999), para posteriormente, tras la modificación de la técnica, ser aplicada en el análisis de poblaciones bacterianas, mediante el análisis de los perfiles de fragmentos amplificados de sus genes ribosómicos (Muyzer y cols., 1993). Su metodología se basa en la posibilidad de que un fragmento de ADN de doble cadena pueda ser desnaturalizado mediante el empleo de medios físicos (temperatura) o químicos (urea o formamida). Dicho punto de desnaturalización cambiará en función del tamaño y la composición de la secuencia de nucleótidos que conforma la cadena

de ADN, aumentando cuando los contenidos en guanina (G) y citosina (C) son altos. Si un fragmento de ADN se desnatura su migración en un gel de electroforesis se detiene o se vuelve más lenta. De forma práctica se usa un gel con gradiente de desnaturalización durante la migración de los fragmentos. Así, 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).

Cabe destacar que esta técnica fue usada en la diferenciación de 67 especies de mollicutes (McAuliffe y cols., 2003; 2005), demostrando de este modo la utilidad y el grado de especificidad que presenta, consiguiendo incluso diferenciar especies cuyo porcentaje de similitud basado en el gen ARNr 16S era del 98 % (Jensen y cols., 2003). Posteriormente, 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 un patrón de bandas único 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). No obstante, existen especies cuyo perfil de DGGE es idéntico, siendo el caso de los micoplasmas aviares aislados en paloma *M. columbinum* y *M. columbinasale*, que por otro lado mostraban una similitud de sólo 84% en su ISR (Ramírez y col., 2008a). 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 y cols., 2005). Los análisis previos de la secuencia del gen ARNr 16S y de la ISR en estas especies mostró que poseían un alto grado de similitud genómica (Pettersson y cols.,

2000; Chalker y Brownlie, 2004). En la actualidad, esta técnica es usada con criterios fenotípicos para identificar organismos (identificación polifásica) (Stackebrandt y cols., 2002).

#### **1.2.8.6.5. Microarrays**

El último avance en la detección e identificación de mollicutes es el desarrollo de chips de microarrays (Volokhov y cols., 2006; Schnee y cols., 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 se lee 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 (Schna y cols., 1996).

#### **1.2.8.6.6. Tipificación bacteriana**

La tipificación bacteriana se corresponde con el 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. Para la realización de esta técnica nos encontramos con:

Métodos basados en el análisis del tamaño de las bandas de ADN (obtenidas a través de digestión enzimática o PCR), se trata del método más utilizado, debido a que el análisis de bandas de ADN puede otorgar, de manera sencilla, un perfil único para cada especie, siendo, además, una técnica fácil y barata.

El análisis del tamaño de las bandas de ADN ser realizado a través de bandas obtenidas mediante digestión enzimática, donde son usadas enzimas de restricción capaces de cortar fragmentos de ADN tras reconocer ciertas combinaciones específicas de nucleótidos, denominados sitios de restricción (Roberts, 2005). Estas son usadas en tres técnicas de tipificación:

1.- Electroforesis en 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). Kokotovic y cols. (2002) determinaron que hay cepas de micoplasmas que pueden permanecer en un mismo individuo sin alterar su perfil PFGE a pesar de su gran variabilidad intraespecífica, mediante la utilización de esta técnica.

2.- Análisis de polimorfismos de longitud en fragmentos amplificados de ADN (*amplified fragment length polymorphism* - AFLP): Para llevar a cabo esta técnica, el ADN debe ser digerido mediante enzimas de restricción. A continuación, aquellos fragmentos obtenidos son amplificados mediante PCR usando cebadores específicos de aquellas secuencias que interesan. Por último, se detectan por secuenciación capilar u otros métodos de observación (Mueller y Wolfenbarger, 1999). A través de este método 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 y cols., 2006).

3.- Análisis de polimorfismos de longitud en fragmentos de restricción tras PCR (*polymerase chain chain reaction - restriction fragment length polymorphism* PCR-RFLP). Similar a la anterior técnica, aunque presenta un orden invertido, ya que, en primer lugar, una secuencia específica es amplificada por PCR, y posteriormente se digiere con enzimas de restricción (Griffiths y cols., 2002). Esta técnica ha sido útil para distinguir cepas de *M. pneumoniae* al analizar el gen P1 (Cousin-Allery y cols., 2000); y entre cepas africanas y australianas de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC empleando el gen *bgl* (Vilei y Frey, 2004).

También mediante bandas obtenidas por PCR es posible el análisis del tamaño de las bandas de ADN, estos métodos son muy utilizados debido a la fiabilidad, gran disponibilidad y la reducción progresiva de los costes que presenta la técnica de PCR. Así nos encontramos con:

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 de estudio. El ADN es amplificado empleando para ello una PCR con bajo rigor (baja temperatura de alineación), de esta manera se obtienen 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 y cols., 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 y cols., 2003).

Análisis de repeticiones en tándem de número variable (*variable number tandem repeat* – VNTR o *multi-locus tandem repeat analysis*- MLVA). Basado en el análisis del tamaño de fragmentos de ADN de zonas repetitivas encontradas en el genoma y amplificadas por PCR. Una vez amplificadas son analizadas 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 amplificadas (Lindstedt, 2005; Van Belkum, 2007). A partir de los datos obtenidos a través de esta técnica ha sido posible la creación de una base de datos, lo que ha hecho que sea ampliamente utilizada como referencia (Allix-Béguec y cols., 2008). A través de VNTR han sido caracterizados algunos micoplasmas como *M. genitalium* (Cazanave y cols., 2012) y *M. pneumoniae* (Dégrange y cols., 2008), entre otros.

Otro método de tipificación es el basado en el análisis directo de secuencias de ADN, que puede ser realizado mediante:

- 1.- Secuencias de genes sencillos, en el cual se analiza un solo gen, lo cual 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, en la clasificación de determinación de especies puede

resultar útil, siendo el caso del gen que codifica el ARNr 16S, mediante el cual está basada la taxonomía bacteriana (Rosselló-Mora y Amann, 2001; Rodicio y Mendoza, 2004). A través de esta técnica fueron diferenciadas cepas de *M. hyopneumoniae* mediante el análisis del gen p146 (Mayor y cols., 2008).

2.- Tipificación multilocus de secuencias (Multilocus sequence typing - MLST). Se trata del método más desarrollado en la actualidad. Se basa en el análisis de variaciones puntuales de las secuencias de genes constitutivos o de mantenimiento (*housekeeping genes*), los cuales sufren una baja presión selectiva por lo que cualquier variación puede asociarse a cambios evolutivos (Maiden y cols., 1998). Los resultados obtenidos a través de esta técnica, como sucede en el análisis de repeticiones en tándem de número variable, se encuentran disponibles en bases de datos, lo cual unido a que la técnica tiene una alta reproducibilidad hace que sea una herramienta muy utilizada actualmente (Chan y cols., 2001). Cabe destacar que esta técnica fue utilizada en la diferenciación de cepas de *M. agalactiae* y *M. hyopneumoniae* (Mayor y cols., 2008; McAuliffe y cols., 2011).

Por último, nos encontramos con aquellos métodos de tipificación basados en la hibridación de sondas de oligonucleótidos marcados, consistentes en una digestión del ADN con enzimas de restricción y su posterior aplicación de la técnica de "Southern blotting", esta técnica permite hibridar los fragmentos obtenidos con oligonucleótidos marcados con isótopos radioactivos, de esta manera es posible la detección de los fragmentos específicos buscados (Griffiths y cols., 2002). Ha sido utilizada en la tipificación de *M. agalactiae* y *M. bovis*, entre otros (Pilo y cols., 2003; Miles y cols., 2005).

### 1.2.9. Patogenicidad y factores de virulencia

La clase Mollicutes engloba a organismos que son considerados en su mayoría como bacterias comensales, calificándose como simbioses aquellos aislados de artrópodos (Hackett y Clark, 1989). En el caso de las infecciones causadas por micoplasmas patógenos, estas suelen ser de carácter crónico, observándose una clara relación entre estos microorganismos y la enfermedad en los animales, plantas e insectos; a pesar de ello no se dispone de suficiente información de los mecanismos que influyen en la patogenicidad de ciertos micoplasmas. La producción de peróxido de hidrógeno y la de radicales superóxido, formados a partir del metabolismo de desecho, han sido descritos como posibles factores de patogenicidad, con capacidad de provocar daño oxidativo en la membrana de las células del hospedador (Almagor y cols., 1984, 1985 y 1986).

No obstante, encontramos otros posibles mecanismos mediante los cuales los micoplasmas puedan desatar la enfermedad en su hospedador. Tales como la presencia de ureasas, por las cuales podría producirse amoníaco, o bien la presencia de la fosfolipasa A<sub>2</sub> en Ureaplasmas, que interviene en el metabolismo de las prostaglandinas, lo que acarrearía problemas durante la gestación (Razin y cols., 1998). Por otra parte, nos encontramos que, el daño causado por los radicales superóxido se ve incrementado en consecuencia a la capacidad que disponen para fusionarse parcialmente con las células hospedadora (Wang y cols., 1993).

Dentro de los micoplasmas que afectan al ganado caprino nos encontramos con *M. mycoides* subsp. *mycoides*, como causante de la perineumonía contagiosa bovina (CBPP). Debido a la importancia de esta enfermedad para el comercio internacional se han realizado muchos

estudios para tratar de desentrañar los factores de virulencia de este micoplasma, no llegándose a identificar los genes que codifican toxinas, adhesinas o sistemas de secreción, descritos en otras bacterias patógenas, incluso tras la secuenciación del genoma completo en 2004 (Westberg y cols., 2004). Se estima que la variación de la fase putativa de lipoproteínas de superficie podría desempeñar un papel frente a la respuesta inmune del huésped, aunque este fenómeno no se encuentra tan pronunciado en *M. mycoides* subsp. *mycoides* como en otros micoplasmas (Glew y cols. 2002).

También ha sido propuesto como mecanismo de virulencia, la estrecha relación de las células huésped y la liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y otras especies de oxígeno reactivo a través del metabolismo del glicerol, como ocurre en *M. pneumoniae* (Hames y cols., 2009). No obstante, algunas cepas de *M. mycoides* subsp. *mycoides*, tales como PG1, T1/44 y V5, poseen la capacidad de metabolizar el glicerol y producir cantidades significativas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como la cepa Afadé, conocida por su virulencia. Se evidenció que, aunque la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se necesita como desencadenante, por sí sola no es el único mecanismo de virulencia, siendo necesaria la translocación del metabolito tóxico dentro de la célula del hospedador, tras una adhesión efectiva (Bischof y cols., 2008).

Además, la capacidad de fagocitosis en el organismo hospedador se puede ver reducida ante la presencia de la cápsula externa del polisacárido, lo que conlleva a que la colonización de los micoplasmas se vea favorecida (Marshall y cols., 1995). Aunque la existencia de cápsulas de carbohidratos se conoce desde los años 60s y se sabe que pueden ser excretados (EPS) o constituir una cápsula (CPS) (Schieck y cols., 2016), todavía queda por esclarecer la función de la

cápsula en micoplasmas (Minion y Rosenbush, 1993), se cree que puede desempeñar un papel en la patogenicidad de estas bacterias, facilitando la adhesión al tejido hospedador (Robb, 1984), aumentando su toxicidad o evadiendo la respuesta inmune celular al dificultar o inhibir los procesos de fagocitosis (Rosenbusch y Minion, 1992, Marshall y cols., 1995). Por ello, la síntesis y secreción de polisacáridos asociados de forma estrecha a la membrana del micoplasma deben de ser mencionados dentro de los factores de virulencia, formando una cápsula conocida como polisacárido capsular (CPS). Siendo los exopolisacáridos (EPS) los polisacáridos secretados de manera libre o aquellos que solamente presenta una pobre adherencia a la membrana. Estos últimos fueron detectados, mediante la inmunoprecipitación en agar, como productos solubles en sangre de ganado en los estadios iniciales de enfermedad ante la infección con *M. mycoides* subsp. *mycoides* (March y cols., 2003). Los polisacáridos fueron considerados candidatos como factores de virulencia en el caso de *M. mycoides* subsp. *mycoides*, ya que podrían estar involucrados en la adhesión, resistencia a la desecación, resistencia a la actividad del complemento o a la estimulación directa de la inflamación. Como consecuencia, las reacciones inmunológicas a inoculaciones intravenosas o subcutáneas fueron objeto de estudio y se realizaron muchos esfuerzos para la caracterización de dichos productos (Bertin y cols., 2015). Mientras que para Schieck y colaboradores (2016) demostraron que los carbohidratos contribuyen a la integridad de la membrana, disminuye la tasa de crecimiento y oculta las adhesinas de las cepas de *M. mycoides*.

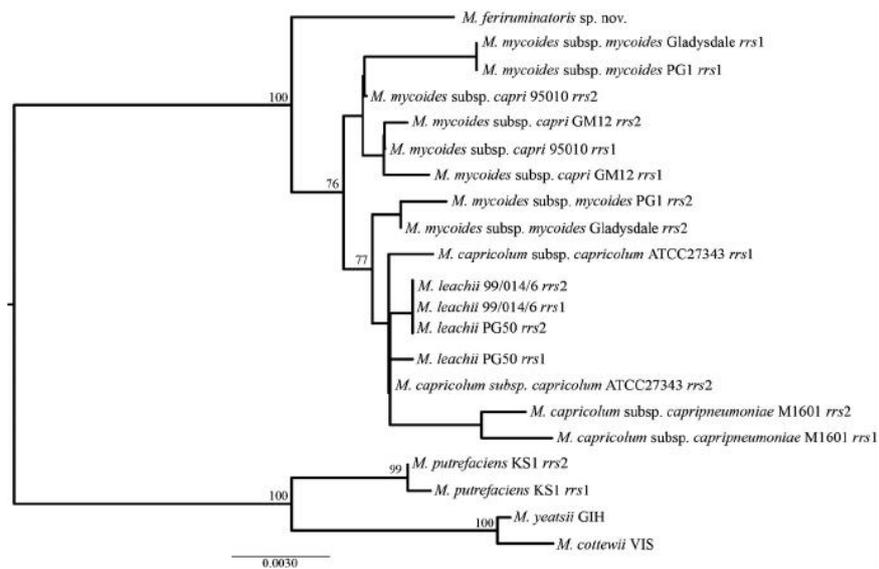
#### **1.2.10. Grupo *Mycoplasma mycoides***

Aunque la mayoría de los micoplasmas se encuentran englobados en los grupos hominis y pneumoniae, el grupo *M. mycoides* era uno de los cuatro grupos filogenéticos originales incluidos

en el grupo Spiroplasma, junto con los grupos *Spiroplasma (Sp.) apis*, *Sp. citri* y *Sp. ixodetis* (Weisburg y cols., 1989). El clásico grupo *M. mycoides* se componía de *M. mycoides* subsp. *mycoides* tipo SC, *M. mycoides* subsp. *mycoides* tipo LC, *M. mycoides* subsp. *capri*, *M. capricolum* subsp. *capricolum*, *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*, y *Mycoplasma* sp. “bovine group 7”, además de otros mollicutes que dichos autores consideraron oportunos de incluir como *M. putrefaciens*, *Entomoplasma ellychniae* y *Mesoplasma entomophilum*. Sin embargo, cuando fueron describiéndose nuevos mollicutes y sus secuencias del gen 16S del ARNr estuvieron disponibles, fue posible definir más grupos filogenéticos y la confusión del grupo *M. mycoides* se aclaró, aunque sus secuencias del gen 16S ARNr no proporcionan suficiente resolución para discriminar entre ellos con precisión, debido a que todos los miembros del grupo están estrechamente relacionados (Weisburg y cols., 1989). Y en 1998, Heldtander y colaboradores concluyeron que *M. putrefaciens*, *M. cottewii* y *M. yeatsii* deberían de estar incluidos en otro grupo, mientras que lo mismo pasaría respectivamente con los entomoplasmas y mesoplasmas. Harasawa y cols. (2000) confirmaron la inclusión de *M. putrefaciens* en otro grupo analizando las regiones intergénicas entre los genes 16S y 23S del ARNr. Y en 2013, Jores y colaboradores describieron una nueva especie de micoplasma que se encontraría genéticamente cercana al grupo *M. mycoides*, aunque sin formar parte del mismo (**figura 1.5**).

Nocard y Roux, en 1896, fueron los primeros en cultivar micoplasmas al conseguir aislar el agente causal de la pleuroneumonía contagiosa bovina (*M. mycoides* subsp. *mycoides*), detallando la capacidad de dicho agente de atravesar filtros porosos que impiden el paso de otras bacterias. Sin embargo, dadas las peculiaridades de este grupo, la elección de la cepa especie representativas del género *Mycoplasma* y de la clase *Mollicutes* ha supuesto una desafortunada

elección para la organización taxonómica de los micoplasmas (Nowak y cols. 1929; Manso-Silván y cols., 2009). La diferenciación entre especies de la clase *Mollicutes* se realizaba clásicamente mediante el uso de ensayos serológicos, tales como test de inhibición de crecimiento. Sin embargo, estos ensayos dentro del grupo *M. mycoides* se han visto obstaculizados por las reacciones cruzadas serológicas entre sus especies, así como la variabilidad existente en ellas (Cottew y cols., 1987). Todo ello creó problemas taxonómicos y de diagnóstico (Manso-Silván y cols., 2009).



**Figura 1.5.** Árbol filogenético obtenido en base a las secuencias del gen 16S del ARNr de especies del grupo *M. mycoides* y especies asociadas (Jores y cols., 2013).

Las pruebas de hibridación de ADN, introducidas a finales de los 60 fueron usadas para definir las relaciones entre los miembros del grupo y apoyar la definición de subespecie dentro del grupo *M. mycoides*. No obstante, se trata de una técnica complicada y que solo permite una comparación global entre muestras de ADN genómico, con lo que los resultados no siempre son concluyentes (Cottew y cols., 1987). Una vez introducida la clasificación basada en la secuencia

del gen que codifica para el ADN ribosomal 16S supuso una base adicional importante en la definición de las relaciones entre las diferentes especies de *Mollicutes*. Aunque el valor de la secuenciación de este gen para el grupo *M. mycoides* ha demostrado ser insuficiente para su clasificación filogenética (Pettersson y cols. 1996). Por lo que se requirieron análisis filogenéticos basados en la secuenciación de la región intergénica 16S-23S, así como el de las proteínas codificantes de genes y espacios intergénicos no tan conservativos para resolver la evolución de las relaciones entre los miembros de este grupo (Harasawa y cols., 2000; Thiaucourt y cols., 2000; Vilei y cols., 2006; Manso-Silván y cols., 2007).

Si bien los últimos hallazgos sobre este peculiar grupo (Manso-Silván y cols., 2009; Shahram y cols., 2010) han permitido la reclasificación de los anteriores taxones y serovares, desde 6 a 5 especies o subespecies para el grupo *M. mycoides* (**Tabla 1.3**), su relación filogenética más cercana se establece con los *Spiroplasma*s (Gasparich y cols., 2004), aunque presentan severas modificaciones respecto al patrón habitual de los *Spiroplasma*s en cuanto a su motilidad y estructura helicoidal, características ausentes en el grupo *M. mycoides*.

Dentro de la clase *Mollicutes*, el llamado grupo *M. mycoides* es único y son de interés particular en medicina veterinaria ya que todos los miembros de este grupo son patógenos de rumiantes. Más específicamente, el grupo está dividido en cinco taxones (ver abajo), cuatro de los cuales incluyen micoplasmas responsables de enfermedades incluidas en la lista de la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE). Y sin embargo, desde un punto de vista filogenético, este grupo pertenece al phylum *Spiroplasma*, que incluye un número de especies aisladas de plantas e insectos (Gasparich y cols., 2004).

	Taxonomía original	Taxonomía actual	Hospedador
Subgrupo mycooides	<i>M. mycooides capri</i>	<i>M. mycooides capri</i>	Caprino
	<i>M. mycooides mycooides</i> LC		
	<i>M. mycooides mycooides</i> SC	<i>M. mycooides mycooides</i>	Bovino
Subgrupo capricolum	<i>M. capricolum capricolum</i>	<i>M. capricolum capricolum</i>	Caprino
	<i>M. capricolum capripneumoniae</i>	<i>M. capricolum capripneumoniae</i>	Caprino
	<i>M. bovine</i> sp. group 7	<i>M. leachii</i>	Bovino

**Tabla 1.3.** Comparación de la taxonomía del grupo *M. mycooides* (Manso-Silván y cols., 2009).

El grupo cuenta actualmente con cinco taxones (especies o subespecies): *M. mycooides* subsp. *mycooides*, que se conocía anteriormente como el biotipo de "pequeñas colonias" "small colonies" (SC), *M. mycooides* subsp. *capri*, *M. capricolum* subsp. *capricolum*, *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*, y *M. leachii*. Además, *M. mycooides* subsp. *capri* se subdivide a su vez en dos serotipos: el serotipo "grandes colonias" "large colonies" (*M. mycooides* subsp. *capri* serovar LC) y el serovar capri (*M. mycooides* subsp. *capri* serovar capri). Estos taxones están relacionados muy estrechamente en su genética y comparten un número de características fenotípicas comunes. Sin embargo, difieren en términos de su prevalencia mundial, la severidad de las enfermedades asociadas y su impacto económico (Tardy y cols., 2009). Dentro de dicho grupo encontramos dos subespecies que son particularmente importantes: *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* y *M. mycooides* subsp. *mycooides*, agentes etiológicos de la perineumonía contagiosa caprina (CCPP) y la perineumonía contagiosa bovina (CBPP) respectivamente (Bertin y cols., 2005). Estas enfermedades afectan sustancialmente al sector de la ganadería, especialmente en países en desarrollo a través de la pérdida de productividad, mortalidad y restricciones en el comercio

internacional. Son enfermedades transfronterizas y constituyen una amenaza a los países que están libres de enfermedad (Kama-Kama y cols., 2016).

El origen estimado del grupo *M. mycoides* parece coincidir con el comienzo de la domesticación de grandes y pequeños rumiantes, alrededor de 10.000 años atrás. La domesticación se asoció tanto con el establecimiento de grandes poblaciones de rumiantes como guardar diferentes especies juntas. Ambos factores pueden haber contribuido a crear las condiciones ambientales favorables para la diseminación y diversificación del grupo a medida que los organismos se fueron adaptando a diferentes hospedadores (Fischer y cols., 2012).

Ya se había demostrado el intercambio genético entre diferentes especies de *Mycoplasma* que comparten un mismo hospedador (Thomas y cols., 2005) y entre poblaciones de micoplasmas que tienen diferentes hospedadores primarios (Fischer y cols., 2012). *M. leachii* parece ser un híbrido entre *M. mycoides* subsp. *mycoides* y *M. capricolum*, incluso una de sus cepas (B144P) contiene ascendencia de todos los miembros del grupo (*M. mycoides* subsp. *capri*, *M. mycoides* subsp. *mycoides* y *M. capricolum*) (Fischer y cols., 2012).

Como las especies del grupo son parásitos obligatorios y necesitan del hospedador para sobrevivir, cualquier transferencia o recombinación de genes tienen que haber ocurrido en el mismo. Hay constancia de que micoplasmas de bovino (*M. mycoides* subsp. *mycoides* y *M. leachii*) han sido aislados de caprinos y lo contrario con *M. mycoides* subsp. *capri*. También se cree que el hospedador podría actuar como un horno de hibridación para nuevas variantes del grupo *M. mycoides*. Las prácticas de pastoreo y resguardo de mezcla de animales han sido comunes en el pasado y se mantienen ampliamente extendidas en África. Esto da la oportunidad

a los hospedadores de infectarse con patógenos de otros hospedadores. La coinfección resultante podría facilitar el intercambio de material genético entre patógenos (Fischer y cols., 2012).

Los micoplasmas son resistentes a muchos antibióticos al carecer de pared celular, por lo que los más usados son las tetraciclinas, antibióticos del grupo macrólidos-lincosamidas-estreptogramina-ketolida y fluoroquinolonas. Sin embargo, cada vez están apareciendo más resistencias a productos que anteriormente funcionaban bien, lo que obliga a estar buscando constantemente nuevos productos efectivos (Kama-Kama y cols., 2016). El desarrollo de una vacuna eficiente ha sido obstaculizado por la falta de comprensión de las interacciones patógeno-hospedador (Schieck y cols., 2016). Actualmente, el control de las enfermedades de rumiantes depende de vacunas subóptimas y la restricción de los movimientos, combinado con políticas de “analizar y sacrificar” (Schieck y cols., 2016).

#### **1.2.10.1. *Mycoplasma mycoides subsp mycoides (Mmm)***

Como ya se mencionó anteriormente, este micoplasma fue cultivado y caracterizado por primera vez por Nocard y Roux (1896). En el ganado vacuno nos encontramos con Mmm tipo “colonias pequeñas” (Small Colony) como causante de la perineumonía contagiosa bovina (CBPP), enfermedad respiratoria incluida en la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la OIE y considerada como una de enfermedades con mayor repercusión económica del ganado vacuno en el continente africano. El ganado infectado puede desarrollar enfermedad aguda, subaguda o crónica. La enfermedad aguda se caracteriza por presentar fiebre, pérdida del apetito, respiración agitada y dolorosa, tos y descarga nasal y en el examen postmortem se

observan frecuentemente lesiones pulmonares unilaterales y grandes cantidades de fluido pleural (Sacchini y cols., 2011).

La CBPP se detectó por primera vez en Europa y se introdujo en África, América del Norte, Australia y Nueva Zelanda durante el periodo de tiempo colonial en los siglos XVIII y XIX a través de movimientos de ganado (Fischer y cols., 2012). La enfermedad fue erradicada de muchos países desarrollados mediante pruebas de diagnóstico y sacrificio de los animales infectados, cuarentena, restricción de los movimientos y vacunaciones en masa. Sin embargo, una infraestructura pobre junto con la práctica del pastoreo nómada en muchos países africanos, hace que la implementación y la sostenibilidad de estas medidas de control sean difíciles (Heller y cols., 2016).

Actualmente se encuentra bastante extendida en el África Subsahariana y amenaza con extenderse a zonas donde actualmente no existe (Krasteva y cols., 2014). Su control es difícil. El tratamiento con antimicrobianos puede aliviar los síntomas clínicos, pero no impedir la propagación de la infección, pudiendo favorecer la aparición de portadores crónicos. El único método de control de esta enfermedad es la vacunación mediante la cepa viva atenuada T1/44. Esta vacuna ofrece inmunidad a corto plazo, pero se caracteriza por una eficacia limitada, efectos secundarios ocasionales en el sitio de la inyección y la necesidad de una cadena de frío (Tulasne y cols., 1996; Heller y cols., 2016). En muchos países del África subsahariana, el control de la perineumonía contagiosa bovina se basa en la vacunación, pero esta estrategia no erradica la enfermedad. De hecho, la perineumonía contagiosa bovina ha vuelto a entrar recientemente en países como Tanzania, que anteriormente se habían considerado libre de la enfermedad. África

del Norte siempre ha sido libre a CBPP y los países del sur de África, como Botsuana, mantienen dicho estatus de libre a CBPP gracias a las estrictas políticas de control y erradicación (Dupuy y cols., 2012). Ante la ausencia de mejores vacunas el mejorar los tests de diagnóstico para ser utilizados en análisis recurrentes representa una opción para el control de la CBPP en África, como el test ELISA descrito por Heller y colaboradores (2016).

En otros continentes, como América del Norte y Europa, la perineumonía contagiosa bovina fue erradicada con éxito entre 1896 y 1935 por los programas de erradicación; Australia inició el control de la vacunación antes de adoptar políticas de erradicación. En el sur de Europa la enfermedad persistió en la península Ibérica, con brotes que ocurren esporádicamente en intervalos de 10-15 años. La reaparición de la perineumonía contagiosa bovina en Europa a principios de 1990 fue bastante inesperada, especialmente para Italia, donde el riesgo de la contaminación debería haber sido mínimo, ya que limita exclusivamente con países libres de CBPP. Los estudios epidemiológicos clásicos fracasaron para explicar el origen de estos brotes. En ese momento hubo una falta de herramientas genéticas para detectar, identificar y subtipar con precisión a Mmm, el agente causal de la perineumonía contagiosa bovina (Dupuy y cols., 2012). En la segunda mitad del siglo XX, la perineumonía contagiosa bovina hizo su reaparición en el sur de Europa: España, Portugal e Italia, de donde fue erradicada con un gran costo a través de una política de vigilancia epidemiológica, el control de los movimientos de animales y el sacrificio sanitario de ganado bovino, infectado o sospechoso de estar infectados (Tonelli y cols., 2012).

Mmm es una especie relativamente homogénea y pocos métodos de tipificación han sido capaces de detectar diferencias significativas entre cepas. Algunos estudios han encontrado

variaciones en cepas africanas, pero no han sido capaces de subdividir las cepas europeas (Cheng y cols., 1995; Gonçalves y cols., 1998; Lorenzon y cols., 2000). La secuenciación de todo el genoma de la cepa tipo (PG1) en 2004 ha hecho posible la mejora en la caracterización de este micoplasma (Westberg y cols., 2004).

Su genoma está caracterizado por un único cromosoma circular de 1.211.703 pb con el menor contenido de G+C (24 mol%) y la mayor densidad de secuencias de inserción (13% del tamaño del genoma) de todos los genomas bacterianos secuenciados hasta el momento. El genoma contiene 985 genes con una longitud media de 982 pb. Solamente al 59% de ellos se les ha asignado una función, mientras que el 27% son exclusivos de dicho micoplasma y un 14% tienen función desconocida, pero muestran una homología significativa con genes de otras especies de micoplasma (Nicholas y cols., 2008). Muestra reacciones cruzadas serológicas con *M. mycoides* subsp. *capri* y comparte antígenos con *M. leachii* (Manso-Silván y cols., 2009).

Se ha identificado una variedad de factores de virulencia potenciales, incluyendo genes que codifican proteínas de superficie variable, enzimas y proteínas de transporte, responsables de la producción de peróxido de hidrógeno y de la cápsula, las cuales podrían tener efectos tóxicos en el animal (Nicholas y cols., 2008), como se comentó en el apartado de factores de virulencia.

#### **1.2.10.2. *Mycoplasma mycoides* subsp *capri* (Mmc)**

Inicialmente fue designado como *Asterococcus mycoides* variedad *capri* (Edward, 1953), no siendo hasta 1956 cuando adquiere el nombre del género *Mycoplasma* (Edward y Freundt, 1956). La cepa tipo, PG3, fue aislada en 1950 en un caso de neumonía de cabras en Turquía (Tully

y cols., 1974). Actualmente engloba dos serovares: Mmc serovar LC y Mmc serovar capri (Tardy y cols., 2009).

Mmc cuenta con una de las distribuciones geográficas más amplias dentro de los micoplasmas de rumiantes, ya que podemos encontrarlo en todos los continentes donde hallemos pequeños rumiantes y, en los cuales existan evidencias de agalaxia contagiosa o pleuroneumonía. Se tiene constancia de nuevos aislamientos desde cabras en lugares como Nueva Zelanda, Chile o Los Países Bajos (Nicholas, 2004). En las Islas Canarias se detectó una seroprevalencia del serovar LC de un 16% aproximadamente en rebaños de cabras infectados al utilizar un test de ELISA comercial (Dr. Bommeliang) (Déniz, 1996), aunque posteriormente esta prevalencia se vio incrementada al 67% al utilizar un ELISA indirecto (Assunção y cols., 2004).

Mmc se encuentra asociada a varios síntomas en pequeños rumiantes, los cuales incluyen mastitis, artritis, queratoconjuntivitis, neumonía y septicemia (Manso-Silván y cols., 2009). También es uno de los agentes causales del síndrome de la agalaxia contagiosa, que incluye todos los síntomas anteriores; si bien es importante puntualizar que hay otros dos micoplasmas responsables de la agalaxia contagiosa que no pertenecen al grupo *M. mycoides*, el más cercano filogenéticamente hablando es *M. putrefaciens* y otro con relación filogenética remota, *M. agalactiae* (considerado como el agente causal clásico de la agalaxia contagiosa en ovejas) (Tardy y cols., 2009). En animales jóvenes la mortalidad suele ser elevada y se observa poliartrosis, neumonía y menos frecuentemente diarrea, queratoconjuntivitis y afección del sistema nervioso central (Bergonier y cols., 1997). Aunque afecta principalmente a las cabras, también ha sido aislado de ovejas con enfermedad clínica/subclínica y muy raramente de vacuno y cabras salvajes

(Perrin y cols., 1994; Bergonier y cols., 1997). Esta especie ha sido aislada ocasionalmente, de ovejas con balanopostitis y vulvovaginitis (Trichard y cols., 1993). No obstante, hay constancia de su aislamiento en algunos casos en ganado vacuno, así Perreau (1979) aisló este micoplasma desde uno de cuatro casos de pericarditis, pleuritis y bronconeumonía en ganado vacuno en Francia. Por otro lado, Mmc fue detectado en fetos de abortos de bovinos (Kapoor y cols., 1989).

Aunque no se hayan aislado, la presencia de anticuerpos frente a esta especie ha sido descrita en camélidos sudamericanos (Hung y cols., 1991). Ocasionalmente se ha podido aislar de abortos espontáneos en bovino (Kapoor y cols., 1989), además de lavados prepuciales de toros (Sylla y cols., 2005) y semen de bovino (Stradaioli y cols., 1999).

La cepa Y-goat (MmcLC) representa un serovar que presenta reacciones serológicas cruzadas con Mmm (Manzo-Silván y cols., 2009), de ahí la confusión taxonómica original. En un principio se pensó que aquellas cepas de Mmm aisladas de cabras producían grandes colonias (LC) *in vitro*, mientras que las cepas aisladas desde ganado vacuno formaban pequeñas colonias (SC), lo cual se usaba para la distinción entre Mmm serovar LC y SC (Cottew y Yeats, 1978). La sintomatología de este serovar (LC) es la misma que la señalada para el serovar capri, ocasiona con frecuencia neumonías, abortos y mortalidad (Atalaia y cols., 1986; Rodríguez y cols., 1995a). Así mismo, también ha sido aislado de abortos espontáneos en caprinos (Rodríguez y cols., 1995b).

### **1.2.10.3. *Mycoplasma capricolum* subsp *capricolum* (Mcc)**

Esta especie afecta predominantemente a cabras, aunque también se ha aislado de ovejas con enfermedad clínica o subclínica y excepcionalmente en vacuno, cabras salvajes y antílopes de

Vaal (Bergonier y cols., 1997; Nicholas y cols., 2005). Como en el caso de MmmLC, se han identificado anticuerpos frente a esta especie en camélidos sudamericanos, aunque nunca se pudo conseguir su aislamiento (Hung y cols., 1991).

Los cuadros clínicos que origina se pueden dividir en dos grandes grupos: la forma aparentemente más generalizada, que cubre todos los síntomas típicos con predominio de la sintomatología articular, y la de sintomatología predominantemente pulmonar, que afecta a algunos países como Marruecos. Los animales jóvenes son muy sensibles y la muerte surge rápidamente, pudiendo además de la triada clásica afectar al sistema nervioso central (DaMassa y cols., 1987a; Bergonier y cols., 1997).

Por otra parte, además de tratarse de uno de los cuatro agentes causales de la agalaxia contagiosa (Bergonier y cols., 1997), este micoplasma ha sido propuesto como patógeno humano potencial (como un agente zoonótico), habiendo sido aislado de pacientes que presentaban síntomas de septicemia (Seersholm y cols., 2015).

#### **1.2.10.4. *Mycoplasma capricolum subsp capripneumoniae* (Mccp)**

Entre las enfermedades causadas por micoplasmas en pequeños rumiantes podemos destacar la pleuroneumonía contagiosa caprina (CCPP – del inglés *contagious caprine pleuropneumonia*), enfermedad que causa graves problemas económicos que afecta a las cabras en el Medio Oriente, el norte y el este de África y Asia. Se encuentra incluida en la lista de las enfermedades de declaración obligatoria de la OIE, su agente causal es el *Mycoplasma capricolum* subespecie *capripneumoniae* (Mccp). Los animales clínicamente afectados responden a una amplia gama de antibióticos, aunque es poco probable que el resultado del tratamiento sea

la eliminación completa del micoplasma. Las vacunas consisten en organismos saponificados y su calidad y efectividad son variables (Nicholas y Churchward 2012).

La CCPP fue descrita por primera vez en 1873 en Algeria, siendo notable que en la mayoría de cabras enfermas solo se viese afectado uno de los pulmones (Thomas, 1873)). En la etiología de la enfermedad se implicó a dos agentes causales, Mmc serovar LC y Mmc serovar capri, ya que éstos micoplasmas producían una pleuroneumonía en pequeños rumiantes parecida a la CCPP. No fue hasta 1976 que un micoplasma, designado como F38 y más tarde reasignado como Mccp fue aislado por primera vez *in vitro* por MacOwan y Minette (1976), utilizando un medio específico que habían desarrollado para este organismo altamente difícil. Su papel como la principal causa de la CCPP clásica fue confirmada después de la realización de infecciones experimentales (Nicholas y Churchward, 2012).

El estatus taxonómico para la cepa tipo de este mycoplasma (F38) no estuvo del todo claro durante mucho tiempo, teniendo que esperar hasta 1993 a ser convertida en subespecie de *M. capricolum* y clasificada como *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* (Leach y cols., 1993). A diferencia de otros miembros del grupo *M. mycoides*, esta subespecie muestra un sorprendente grado de heterogeneidad, sobretodo en la secuencia de sus dos operones ARNr, los cuales contienen los genes que codifican para el ARNr 16S, 23S y 5S (Pettersson y cols., 1996). El aislamiento de Mccp requiere de un alto nivel de experiencia, ya que precisa de medios de crecimiento especiales, siendo una bacteria de difícil cultivo. Se necesitan al menos 5-7 días de incubación a 37°C con unas condiciones de 5% de dióxido de carbono. La identificación basada en pruebas bioquímicas y los tests de inhibición de crecimiento no son definitivos para diferenciar

de aquellos microorganismos relacionados antigénicamente, como los pertenecientes al grupo *M. mycoides*. La PCR específica para Mccp tiene como diana el gen *arcD*, produciendo un fragmento de ADN de 316 pares de bases (Awan y cols., 2010).

#### **1.2.10.5. *Mycoplasma leachii***

Un grupo de cepas, incluida la cepa de referencia PG50, fueron aisladas a partir de ganado con artritis (Simmons y Johnston, 1963) y mastitis (Connole y cols., 1967) en Australia. Dichos aislamientos mostraron una diferenciación serológica con respecto a los otros micoplasmas bovinos conocidos (Leach y cols., 1967), por lo que originalmente se conocían como 'serogrupo 7 de Leach' (Mbg7). El estatus de especie del taxón fue largamente debatido, sobre todo por su bajo número de casos clínico y aislamientos, incluso hay autores que consideran a este micoplasma como otra subespecie de *M. capricolum*, en base a los patrones de SDS-PAGE y análisis de secuencias (Tardy y cols., 2009). En función de los patrones de hibridación ADN/ADN y proteínas se sitúa a esta cepa como una especie intermedia entre *M. mycoides* y *M. capricolum*, la cual exhibe diferencias en las vías metabólicas y antigenicidad, siendo una especie separada dentro del grupo *M. mycoides* y reasignada como *M. leachii* (Manso-Silván y cols., 2009).

Se asociaron con una enfermedad grave en el ganado vacuno, provocando: neumonía, mastitis, poliartrosis y aborto y en los años 60s se reprodujo experimentalmente la enfermedad, confirmando que la cepa P50 es patógena. La distribución geográfica de Mbg7 ha sido pobremente documentada, habiéndose detectados brotes de enfermedad sobre todo en Australia, aunque existen aislamientos de otros continentes (Tardy y cols., 2009). Sin embargo,

hay que matizar que la identificación de Mbg7 no es sencilla, por la presencia de reacciones cruzadas serológicas con Mcc y la falta de especificidad de la PCR (Le Grand y cols., 2004).

La secuenciación del genoma completo de esta especie dio como resultado, obteniéndose un tamaño de genoma de 1.008.951 pares de bases y una escasez de secuencias de inserción en comparación con los hallados para Mmm y la presencia de un elemento integrante que codifica múltiples elementos de codificación repetitiva en políndromos anfipáticos (PARCEL) (Röske y cols., 2010; Wise y cols., 2012).

#### **1.2.10.6. *Mycoplasma cottewii* y *Mycoplasma yeatsii***

Ambos micoplasmas fueron aislados por primera vez del canal auricular externo de cabras, en Australia (DaMassa y cols., 1994). Su diferenciación bioquímica recae en la arginina, la cual es positiva para *M. yeatsii* y negativa para *M. cottewii* (DaMassa y cols., 1994). En base a la secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S ambos micoplasmas se encuentran estrechamente relacionados, solo diferenciándose en cuatro nucleótidos (Heldtander y cols., 1998).

Por otro lado, estos micoplasmas parecen tener poca relevancia clínica, sin embargo, son aislados con frecuencia del conducto auditivo externo de caprinos y a menudo asociado a *M. agalactiae* y/o *Mmc*, ambos patógenos responsables de la agalaxia contagiosa (Dordet y cols., 2013).

#### **1.2.10.7. *Mycoplasma putrefaciens***

Este microorganismo, que afecta principalmente a las cabras, aunque también ha sido identificado en ovejas (Bergonier y cols., 1997), es considerado como un patógeno oportunista (Bergonier y cols., 1997; Gil y cols., 2003). No obstante, se ha demostrado su patogenicidad como especie mediante su aislamiento en brotes de enfermedad (DaMassa y cols., 1987a; Rodríguez y cols., 1994), además de ser capaz de causar enfermedad mediante una inoculación intramamaria experimental, incluso siendo el número de inoculado relativamente bajo, de tan solo unas 50 células (Adler y cols., 1980).

Dentro del cuadro lesional de este micoplasma podemos observar septicemia, mastitis, agalaxia y artritis aguda, además de abortos. Posee tropismo por el tejido mamario y respiratorio, y no se ha comprobado su afinidad por los tejidos oculares (Bergonier y cols., 1997).

#### **1.2.10.8. *Mycoplasma feriruminatoris***

Entre 1993 y 1994, se aisló en cultivo puro *Mycoplasma* sp. de muestras de fluido articular de cuatro íbex alpinos (*Capra ibex*) que murieron en el Zoo de Berlín y que presentaban artritis. Estos aislamientos no pudieron ser asignados a ninguna especie conocida de *Mycoplasma*, pero en base a sus características fenotípicas y genotípicas se vio que se encontraban estrechamente relacionadas con el grupo *M. mycoides*. Fischer y colaboradores (2012) al realizar un análisis MLST (Multilocus sequence typing) de dichas cepas junto con otras sin identificar y cepas pertenecientes al grupo *M. mycoides*, agruparon dichos aislamientos con una cepa aislada de una cabra de las Rocosas (*Oreamnos americanus*) en Estados Unidos antes de 1987. Y el análisis filogenético mostró que las cinco cepas conformaban un grupo fuera del grupo *M. mycoides*, por

lo que se confirmó que las cinco especies pertenecían a un único taxón. Misma conclusión a la que se llegó al analizar las mismas muestras mediante análisis MALDI-TOF MS (Jores y cols., 2013).

Lo más característico de estas cepas era su alta tasa de crecimiento, siendo ésta significativamente más rápida que las del resto de micoplasmas, presentando un tiempo de generación a 37°C de 27-29 min en contra de los 180 min. de Mcc, 200 min. de *M. leachii* y los 220 min. De Mmc. Se demostró que los aislamientos eran una nueva especie y se propuso el nombre de *M. feriruminatoris* (Jores y cols., 2013).





## **Capítulo 2**

Análisis y secuenciación del gen ARNr 23S de  
las regiones intergénicas 16S-23S y 23S-5S

ARNr

---



## 2.1. Introducción

Los ribosomas son orgánulos celulares presentes en todas las células auto-replicas y cuya función es la síntesis de proteínas. Su estructura está compuesta por proteínas y ARN ribosomales (ARNr). Las bacterias tienen tres tipos de ARNr: 5S, 16S y 23S ARNr, cuya información genética se organiza en el genoma en forma de operones (Karl-Erik Johansson y cols. 1998). Las secuencias de nucleótidos de las moléculas de ARNr contienen segmentos bien definidos de diferente variabilidad evolutiva, que a nivel de la molécula 16S ARNr se denominan como regiones universales (U), semiconservativas (S) y variables (V) (Gray y cols. 1984). Independientemente de la especie, el ARNr posee la misma función, lo que nos indica que los genes correspondientes se encuentran bajo la misma presión evolutiva. Debido a ello el análisis de la secuencia del ARNr se hace muy adecuado en estudios filogenéticos y evolutivos (Woose, 1987 y Olsen y cols. 1993).

La gran mayoría de la información molecular de micoplasmas de la que hoy en día disponemos se basa principalmente en la secuencia del gen que codifica el ARNr 16S (Weisburg y cols, 1989). Debido en gran parte a su carácter conservativo y a su menor tamaño relativo al compararlo con el gen que codifica el ARNr 23S, convirtieron inicialmente a este gen, en la estructura génica idónea sobre la que perfilar la taxonomía de la vida procarionta (Ludwig y cols., 1998).

En ocasiones la diferenciación entre diferentes especies de micoplasmas mediante métodos tradicionales de cultivo y técnicas serológicas se hace difícil o casi imposible, por lo cual este tipo de tipificación microbiológica (cultivos selectivos, perfiles bioquímicos, serología, etc.)

ha dado paso a técnicas de biología molecular (Yavari 2010). No obstante, la filogenia funcional, basada en el uso de inhibidores de la síntesis proteica ribosomal, muestra una clasificación bastante similar a la obtenida a través de la secuenciación de los genes ARNr 16S y/o 23S (Amils y cols., 1989; Briones y cols., 1998).

Aunque la información filogenética de las relaciones entre las especies de mollicutes se encuentra establecida a partir de la secuenciación del gen que codifica el ARNr 16S, ésta es insuficiente para el grupo *M. mycoides* (Pettersson y cols. 1996). Debido a este hecho han sido necesarios análisis filogenéticos basados en las regiones intergénicas 16S-23S, las cuales no son tan altamente conservativas, llegando a ser empleadas con el fin de reconsiderar la relación evolutiva del grupo *M. mycoides* (Manso-Silván y cols. 2009).

La Region Intergénica 16S-23S ARNr (ISR) ha demostrado ser una valiosa herramienta como complemento taxonómico en las especies del Género *Mycoplasma*, ya que alberga dominios tanto conservativos como variables (Harasawa y cols 2000). Así, la región ISR se ha utilizado como un marcador genético para la comparación de las relaciones filogenéticas de las especies estrechamente relacionadas genéticamente no sólo entre los micoplasmas (Harasawa, 1999), sino también entre otras especies bacterianas. Usándose, además, como apoyo en la identificación de posibles nuevas especies (Chalker y Brownlie, 2004; Spergser y Rosengarten, 2007), y en su posterior caracterización como especies reconocidas (Spergser y cols., 2007; Suárez-Pérez y cols., 2012) y como herramienta en diagnóstico y estudios epidemiológicos (Raviv y cols. 2007; Sashida y cols. 2013). Además, ha facilitado la separación de biovares en especies distintas del género *Ureaplasma* (Harasawa y Kanamoto, 1999).

Además de la variabilidad de la ISR entre distintas especies, también se pueden presentar variaciones en la secuencias de diferentes cepas pertenecientes a un mismo taxón (Gürtler y Stanisich, 1996; Gürtler, 1999), pudiendo dichas variaciones funcionar como marcadores moleculares para el tipado de cepas en bacterias (Gürtler, 1993; Cartwright y cols., 1995; Houpiqian y Raoult, 2001) y más concretamente, en especies del género *Mycoplasma* (Raviv y cols., 2007; Yavari y cols., 2007; Ramírez y cols., 2011).

A parte de su uso en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana, la ISR ha sido empleada en el diagnóstico específico de microorganismos (Barry y cols., 1991), identificación de especies del género *Mycoplasma* en cultivos celulares (Harasawa y cols., 1993), identificación de mollicutes incultivables (Smart y cols., 1996), identificación especie-específica en aislamientos clínicos (Takahashi-Omoe y cols., 2004), diagnóstico directo sobre muestras clínicas (Chalker y cols. 2004) y para el diseño de PCRs aún más específicas que aquellas diseñadas sobre el gen que codifica el ARNr 16S (Ramírez y cols., 2006).

Además del papel central del gen que codifica el ARNr 16S en el estudio de la biología bacteriana, y de la importancia de la ISR, descrita anteriormente, el gen que codifica al ARNr 23S también ocupa un papel destacable en estudios de taxonomía bacteriana. La función biológica del gen ARNr 23S ha sido estudiada en profundidad debido a la relevancia funcional que posee su estructura en la conformación de la subunidad 50S del ribosoma procariota. Dicha funcionalidad se encuentra condicionada por la configuración peptídica de la subunidad, y por tanto de la información codificada en el gen del ARNr 23S.

La información acerca del gen ARNr 23S ha ido progresando gradualmente, como contuación en la mayoría de los casos al estudio científico del gen que codifica el ARNr 16S (Brosius y cols., 1980; Ludwig y cols., 1992). Debido a que el gen que codifica el ARNr 23S posee una mayor variabilidad entre especies en comparación al gen ARNr 16S (Ludwig y cols., 1995), ha sido posible desarrollar con éxito aplicaciones de carácter taxonómico (Guo y cols., 2000; Hunt y cols., 2006) y de diagnóstico (Sung y cols., 2006) en especies de diferentes géneros de la Clase *Mollicutes* en base a dicho gen.

No obstante, este gen se ve sometido a alteraciones puntuales en su secuencia, que se reflejan como mutaciones que confieren resistencia frente a antibióticos (Sigmund y cols., 1982; Ettayebi y cols., 1985), lo cual ha enfocado el trabajo científico sobre este gen en las especies del género *Mycoplasma* en el estudio de dichas mutaciones (Lucier y cols., 1995; Okazaki y cols., 2001; Pereyre y cols., 2002; Wu y cols., 2005; Stakenborg y cols., 2005; Li y cols., 2012).

Dentro de la clasificación filogenética de los micoplasmas, el grupo *M. mycoides* siempre ha supuesto una dificultad añadida, debido sobre todo a las secuencias del gen 16S ARNr de las especies incluidas en este grupo no proporcionan suficiente resolución para discriminar entre ellas con precisión, causado por la estrecha relación genética que comparten todos los miembros de este grupo (Weisburg y cols., 1989).

Con estos antecedentes, decidimos enfocar este capítulo en el análisis de secuencias de la ISR y del gen codificante para el ARNr 23S de cepas representativas del grupo *M. mycoides* con el fin de profundizar y mejorar el conocimiento de la filogenia de este grupo usando pruebas genéticas basadas en secuenciación.

## 2.2. Materiales y métodos

### 2.2.1. Especies bacterianas estudiadas

Las diferentes especies empleadas en este estudio fueron obtenidas del cepario del laboratorio de epidemiología y medicina preventiva del Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria (IUSA) del Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Las cepas seleccionadas fueron aquellas establecidas como cepas de referencia de cada una de las especies en cuestión (tabla 2.1).

Especie	Identificación cepa	Acrónimo
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> tipo LC	Y-Goat	MmmLC
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> tipo SC	PG1	Mmm
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i>	PG3	Mmc
<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>	California Kid (CK)	Mcc
<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capripneumoniae</i>	F38	Mccp
<i>M. leachii</i>	PG50	Mleach
<i>M. cottewii</i>	VIS	Mcot
<i>M. yeatsii</i>	GIH	Myeat
<i>M. putrefaciens</i>	KS1	Mptr

**Tabla 2.1.** Especies y cepas empleadas en el estudio.

### 2.2.2. Identificación por cultivo y clonaje de colonias

Cada cepa fue reconstituida a partir de cultivos liofilizados. Los organismos fueron cultivados en los medios de PH o SP4-II líquido (Kirchhoff y Rosengarten, 1984; Ramírez y cols., 1997) (Anexo 2.1) suplementado con entre un 10 y un 20% de suero de caballo. Todas las cepas reconstituidas fueron incubadas a una temperatura de 37°C.

Los parámetros de crecimiento bacteriano valorables en la identificación de los micoplasmas se realizaron tanto en medio de cultivo líquido como posteriormente en placas de medio sólido.

El crecimiento en medio de cultivo líquido se puede apreciar por un aumento de la turbidez del mismo. Además, gracias a la inclusión de rojo fenol en el medio SP4-II, podemos distinguir un cambio de coloración del mismo (desde rojo hacia naranja) debidos a modificaciones en el pH del medio, asociado al crecimiento bacteriano.

En el medio sólido, las estructuras de las colonias fueron categorizadas según la morfología observada, clasificándose en colonias típicas de micoplasmas (colonias con morfología de “huevo frito”) o colonias irregulares o atípicas (pseudocolonias). Finalmente se determinó la presencia o ausencia de películas y cristales en las placas de medio sólido.

Los diferentes cultivos fueron sometidos a un proceso consecutivo de triple clonaje, con el fin de asegurar la homogeneidad de los mismos. Para este proceso, las muestras con capacidad de producir colonias fueron inoculadas en nuevos tubos de medio realizando una dilución decimal, para ser posteriormente resembrarlas de nuevo, en placas de medio sólido. Con puntas estériles, se recogieron colonias individuales, que se depositaron en tubos de medio PH o SP4-II estériles. Este proceso se repitió tres veces para asegurar la pureza de los cultivos.

### **2.2.3. Características bioquímicas y enzimáticas**

La clasificación de los cultivos en base a sus características bioquímicas y enzimáticas se realizó siguiendo la metodología descrita por Poveda (1998) y Poveda y Nicholas, (1998), tal y como se describe a continuación.

Con este fin se elaboraron distintos lotes de medio PH y SP4-II suplementados con un 1% de glucosa, 1% de manosa, 1% de arginina, 1% de urea y 1% de tetrazolium respectivamente. Se tomaron 200 µl desde cada cultivo y se resuspendieron en cada uno de los medios modificados para análisis bioquímico/enzimático. Posteriormente fueron añadidos 500 µl de parafina estéril, con el fin de obtener reacciones en anaerobiosis. Para cada uno de los diferentes medios se utilizó un control negativo, compuesto por medio modificado sin inóculo, pero si con parafina estéril. Todos los cultivos fueron incubados a 37°C.

#### Fermentación de la glucosa

Esta prueba se consideró positiva al producirse un descenso del pH del medio de al menos media unidad. Este descenso del pH va asociado a un viraje del color del medio hacia amarillo. Si el color del medio inoculado permaneció inalterado o la disminución fue menor del 0,5 del pH, al pasar 15 días, esta prueba se consideró negativa.

#### Fermentación de la manosa

Los resultados de esta prueba se rigieron por las mismas características que la prueba de la fermentación de la glucosa descrita anteriormente.

#### Hidrólisis de la urea

Si la cepa investigada presentaba actividad ureásica, el pH aumentaría al menos 0,5, por lo que el color del indicador de pH (rojo fenol) viraría hacia un tono rojo-violeta. El periodo máximo de incubación de esta prueba hasta considerarse como negativa fue de 15 días. Con esta prueba se diferencian los ureaplasmas, los únicos que presentan dicha actividad, del resto de los *Mollicutes*.

#### Reducción del trifenil-tetrazolium

La positividad de la reacción se pudo observar por la presencia de un precipitado rojo en el fondo del tubo.

#### Hidrólisis de la arginina

Con esta prueba se pretendía detectar la actividad de la enzima arginina dehidrolasa. Se inoculó el medio con 200 µl de cultivo fresco y se creó la condición de anaerobios tras añadir 0,5 ml de parafina líquida estéril. Si la cepa investigada presentaba la enzima arginina dehidrolasa, el pH aumentaría al menos 0,5, por lo que el color del indicador de pH (rojo fenol) viraría hacia un tono rojo-violeta. El periodo máximo de incubación de esta prueba hasta considerarse como negativa fue de 15 días

#### Producción de películas y cristales

Esta prueba está orientada a poner de manifiesto la presencia o ausencia de actividad lipolítica por parte de los micoplasmas, asociada a la acción enzimática de una lipasa endógena, que al reaccionar con el colesterol y fosfolípidos da lugar a la producción de una película característica que cubre las colonias. Además, dicha acción enzimática sobre los ácidos grasos genera la producción de cristales (depósitos de sales de calcio y magnesio). Ambas estructuras

son observables usando un microscopio óptico en placas de cultivo con medio sólido a 40 aumentos (40x). Con el fin de observar esta característica se sembraron 200 µl de cada cultivo en placas de medio PH y SP4-II sólido, retirando tras 10 minutos el exceso de líquido que no fuese absorbido por el agar. A continuación, se dejaron en incubación a 37°C durante 24-72 horas.

Un resultado positivo se caracteriza por la formación de cristales alrededor de las colonias. En caso de ser positiva (formación de películas y cristales), si añadimos abundante agua destilada a la placa, se debe producir un desprendimiento de una fina capa de lípidos que quedará flotando sobre la superficie de la placa. Ambos efectos siempre aparecen juntos como resultado de la acción de la enzima lipasa.

#### **2.2.4. Extracción de ADN**

El ADN a analizar por técnicas de secuenciación se obtuvo a partir de cultivos puros caracterizados siguiendo la metodología descrita anteriormente. Con el fin de obtener muestras de ADN de alta calidad y reducir la posible variabilidad en las muestras asociada al proceso de obtención de ADN, se utilizó un kit de extracción comercial (Realpure Genomic DNA Extraction Kit, REAL, España), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El protocolo de extracción se inició a partir de un mililitro de cultivo puro transferido a un eppendorf, donde se centrifugó a 14000 g durante 90 segundos. Una vez centrifugado se desechó el sobrenadante, conservándose el pellet celular. Posteriormente se añadieron 600 µl de solución de lisis y 3 µl de proteínasa K, seguido de un paso de incubación de las muestras durante 1 hora a 55°C. A continuación, se incubó a 80°C durante 5 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Una vez finalizada la fase de lisis celular se comenzó la precipitación de proteínas, para

lo cual se añadieron 300 µl de solución de precipitación de proteínas, que se mezcló usando el vortex durante unos 20 segundos, seguido de un paso de centrifugación a 14000 g por 5 minutos, con el fin de depositar las proteínas en el fondo del eppendorf. A continuación, se pasó con cuidado el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf desechando, en esta ocasión, el tubo con el precipitado. La siguiente fase tuvo como objetivo la precipitación del ADN, para lo cual se añadieron 600 µl de isopropanol al eppendorf que contenía el sobrenadante de la fase anterior y se mezcló por inversión varias veces. Posteriormente se centrifugó a 14000 g durante 3 minutos y se eliminó el sobrenadante, asegurándonos de que en el eppendorf se localiza un pequeño pellet, el cual corresponde con el ADN del micoplasma en cuestión a analizar. Tras la centrifugación se añadieron 600 µl de etanol al 70% y se mezcló por inversión con el fin de lavar el pellet de ADN. A continuación, se centrifugó a 14000 g durante 2 minutos. Tras la centrifugación se eliminó el sobrenadante cuidadosamente, con el fin de evitar perder el pellet de ADN. Una vez eliminado el sobrenadante, se dejó secar el tubo eppendorf invertido sobre papel de filtro durante unos 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se procedió a la hidratación del ADN, para lo cual se añadieron 200 µl de solución hidratante de ADN y se incubó a 65°C durante una hora con agitaciones periódicas. Una vez finalizada la extracción se conservaron las muestras de ADN a -20°C hasta su posterior uso.

#### **2.2.5. Confirmación de la identificación mediante secuenciación del gen ARNr 16S**

La identificación confirmatoria de los cultivos y cepas obtenidos desde los cultivos liofilizados se realizó mediante técnicas de biología molecular, combinando PCR convencional y secuenciación del producto de PCR amplificado a partir del ADN extraído anteriormente. La técnica de PCR fue llevada a cabo con cebadores específicos para regiones específicas del gen

que codifica para el ARNr 16S. Se precisaron tres parejas de cebadores para dicha PCR (Lane y cols., 1985), cuya secuencia se muestra en la **tabla 2.2**, para cada una de las especies. El protocolo de amplificación se muestra en la **tabla 2.3** (Ramírez y cols. 2007).

Fragmento	Cebador	Secuencia 5'-3'
A	16S-start position	5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAGG-3'
	16S-550 neg	5'-CCCAATAAATCCGGATAACGCTGC-3'
B	16S-510 pos	5'-GTGACGGCTAACTATGTGCCAGCAG-3'
	16S-1050 neg	5'-GCTGACGACAACCATGCACC-3'
C	16S-980 pos	5'-CGAAGAACCTTACCACTCTTGACATC-3'
	16S-end neg	5'-GGTAATCCATCCCCACGTTCTCG-3'

**Tabla 2.2.** Cebadores empleados en la secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S (Lane y cols., 1985)

Paso	Temperatura	Tiempo	Repeticiones
1	94°C	2 minutos	1x
2	94°C	15 seg.	35x
3	60°C	30 seg.	
4	72°C	2 minutos	
5	72°C	30 seg.	1x
6	4°C	Temperatura de mantenimiento hasta retirar del termociclador	

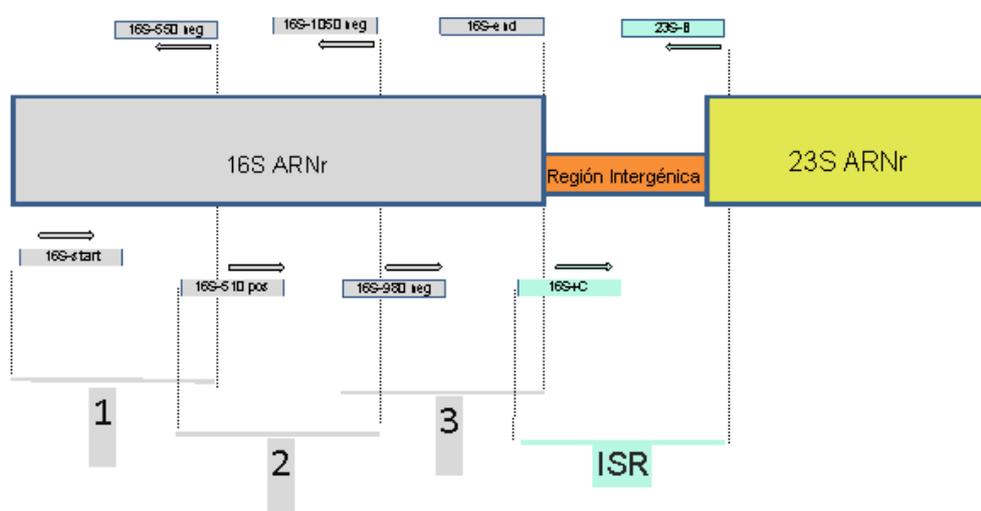
**Tabla 2.3.** Protocolo de amplificación por PCR empleado para la obtención de productos amplificados destinados a secuenciación (Ramírez y cols. 2007).

### 2.2.6. Amplificación de la región región intergénica 16S-23S ARNr y evaluación diagnóstica basada en DGGE de esta región

La amplificación de la región intergénica 16S-23S ARNr (ISR 16S-23S) se obtuvo mediante un único producto amplificado, empleando una única pareja de cebadores siguiendo la metodología descrita por Ramírez y cols. (2007). La secuencia e identificación de los cebadores se encuentra detallada en la **tabla 2.4**. En la **figura 2.1** podemos apreciar la disposición esquemática de estos cebadores, así como la disposición relativa de las parejas de cebadores empleadas habitualmente para la amplificación del gen que codifica al ARNr 16S.

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

**Tabla 2.4.** Cebadores empleados en la secuenciación de la región intergénica 16S-23S ARNr.



**Figura 2.1.** Representación esquemática de la posición de los cebadores empleados para la amplificación por PCR del gen que codifica al ARNr 16S y la región intergénica 16S-23S ARNr.

Los fragmentos amplificados del gen que codifica el ARNr16S están representados con los números 1, 2 y 3. El fragmento amplificado de la región Intergénica 16S-23S ARNr está

representado como ISR. El protocolo empleado para la amplificación del producto de la Región Intergénica 16S-23S ARNr fue el mismo utilizado para la amplificación del gen que codifica al 16S ARNr, mostrado en la **Tabla 2.3** del presente capítulo. En lo que respecta a la técnica DGGE, se realizó siguiendo el protocolo descrito por McAuliffe y colaboradores (2005), usando el sistema DCode Universal Mutation Detection System (BioRad) usando los primers 16S+C y 23S–B.

### 2.2.7. Amplificación de gen codificante para el ARNr 23S

Fueron necesarias 6 parejas de cebadores para la obtención de la secuencia completa del gen objeto del estudio. Siendo este dividido de esta manera en 6 fragmentos (Fragmento A, B, C, D, E y F), y siendo amplificado cada uno de ellos por una pareja diferente de cebadores (**Tabla 2.5**).

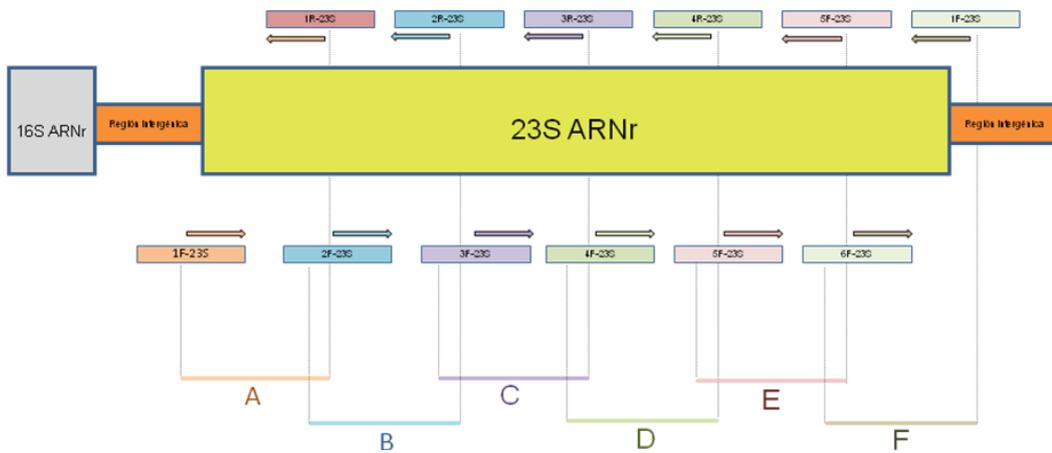
Secuencia	Cebadores	Secuencia (5´-3´)
Fragmento A	1F-23S	5´-GTT CTT TGA AAA CTG AAT ATT A-3´
	1R-23S <i>Cpn 1R*</i>	5´-CTT TTC ACC TTT CCC TCA CGG TAC-3´ 5´-CGG GGC TAT CAC CCT CTA TGG CGC-3´*
Fragmento B	2F-23S	5´-GCG AAA TCG GAA GAG GCC AAA C-3´
	2R-23S	5´-CAC CGC TAG CCA CCA GTC ATC C-3´
Fragmento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

**Tabla 2.5.** Cebadores empleados en la PCR destinada a la amplificación del gen que codifica el ARNr 23S previa secuenciación. \*Usado para la amplificación del fragmento A de *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*.

El fragmento A del gen ARNr 23S perteneciente a *Mycoplasma capricolum* subespecie *capripneumoniae* no pudo ser amplificado usando el set de cebadores descrito anteriormente,

por lo que fue preciso diseñar un cebador específico denominado Cpn 1R, por lo que para analizar el fragmento A de este micoplasma se empleó el juego de cebadores 1F-23S y Cpn 1R (5'-CGG GGC TAT CAC CCT CTA TGG CGC -3').

En la **figura 2.2** se puede observar tanto la disposición esquemática como la posición relativa de los cebadores empleados para la amplificación del gen codificante del ARNr 23S.



**Figura 2.2.** Representación esquemática de la posición de los cebadores empleados para la amplificación por PCR del gen que codifica al ARNr 23S.

Los protocolos de ciclos y temperaturas para la amplificación del gen que codifica el ARNr 23S utilizados en el termociclador fueron los siguientes, siendo el primero de ellos, utilizado para la amplificación de los fragmentos A y F (**Tabla 2.6**), y el segundo, fue aplicado para obtener la amplificación de los fragmentos B, C, D, E (**Tabla 2.7**):

Ciclo	Repeticiones	Temperatura	Tiempo
1	1	94°C	120 seg.
2	35	94°C	15 seg.
		45°C	30 seg.
		72°C	120 seg.
3	1	72°C	60 seg.
4	1	4°C	Hold

**Tabla 2.6.** Protocolo PCR para segmentos A y F.

Ciclo	Repeticiones	Temperatura	Tiempo
1	1	94°C	120 seg.
2	35	94°C	15 seg.
		55°C	30 seg.
		72°C	120 seg.
3	1	72°C	60 seg.
4	1	4°C	Hold

**Tabla 2.7.** Protocolo PCR para segmentos B, C, D y E.

### 2.2.8. Amplificación de la región región intergénica 23S-5S ARNr

Para la realización de la secuenciación de esta región, se llevo a cabo una prueba con dos parejas de cebadores, usando algunas de las cepas del estudio, hasta encontrar la combinación óptima (**Tabla 2.8**).

Las cepas de micoplasmas seleccionadas para la realización de la evaluación de esta región fueron: MmmLC, Mmc, Mccp, Mbovis y Myeat. Tras evaluación de ambos pares de cebadores se seleccionó el par1 para llevar a cabo la secuenciación de la región intergénica 23S-5S.

Cebadores	Secuencia (5´-3´)
<b>Pareja 1</b>	
23S+H	5´- GCT CTT AGT ACG AGA GG-3´
5S-A	5´- GCT TAA CTT CTG TGT TCG GAA -3´
<b>Pareja 2</b>	
6F-23S	5´- GAA AGT AGG ACT TAG TGA TCC GG-3´
5S-A	5´- GCT TAA CTT CTG TGT TCG GAA -3´

**Tabla 2.8.** Cebadores empleados en la secuenciación/DGGE de la región intergénica 23S-5S ARNr.

### 2.2.9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de todos los fragmentos a estudiar (gen ARNr 16S, ISR 16S-23S, gen ARNr 23S, ISR 23S-5S) se realizó en un termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) mediante el uso del kit comercial Pure Taq Ready-To-Go™ PCR Beads (GE Healthcare), compuesto por reacciones de PCR premezcladas, con el fin de reducir posibles fuentes de variabilidad y homogeneizar resultados.

La PCR se elaboró para cada una de las muestras a estudiar sobre un volumen total de 25 µl, de los cuales 3 µl se correspondían con el ADN extraído, 2 µl con ambos cebadores (1 µl de cada uno de los cebadores a cada reacción) y 20 µl de H<sub>2</sub>O estéril purificada. En cuanto a los componentes del kit, en cada tubo de reacción encontramos una pequeña perla (*bead*), compuesta por: estabilizantes, buffer, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, y 2-2.5 unidades de Pure Taq ADN polimerasa. Como controles en las reacciones de amplificación se añadieron 3µl de ADN

conocido como control positivo y 3µl del mismo agua estéril purificada usada en las reacciones como control negativo.

#### **2.2.10. Electroforesis de los productos amplificados**

Los productos amplificados de las diferentes PCRs se confirmaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón de electroforesis (TAE 1X, VWR). Las condiciones de electroforesis fueron 100 voltios durante 35-40 minutos, en función del tamaño del fragmento. Además, se empleó un marcador de peso molecular de diez bandas, comprendidos entre 2000 y 50 pares de bases, como patrón para comprobar el tamaño de nuestro producto amplificado (Amplisize Molecular Ruler, BIORAD).

Para la visualización de los geles de agarosa, estos se tiñeron con una solución de Bromuro de Etidio (Sigma-Aldrich) a una concentración 0.5 µg/ml en agua destilada durante 15-30 minutos. Tras este periodo, se lavaron los geles con agua destilada durante un minuto y se observaron usando un sistema de análisis de imagen bajo excitación con luz ultravioleta (BIORAD).

#### **2.2.11. Secuenciación**

La secuenciación de las muestras se realizó en el Servicio de Genética Forense de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, donde se utilizó el secuenciador 3130 xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems), siendo las secuencias procesadas digitalmente con el software Run 3130xl Data Collection V3.0 (Applied Biosystems).

Todos los productos amplificados por PCR fueron secuenciados por duplicado, utilizando de forma independiente cada cebador en cada una de las reacciones. Por lo tanto, por cada fragmento a estudiar se obtuvieron dos secuencias independientes pero complementarias, una correspondiente al cebador 5'-3' y otra al cebador 3'-5'.

#### **2.2.12. Herramientas informáticas de análisis de secuencias**

##### **2.2.12.1. FinchTV (versión 1.4.0)**

Este programa fue empleado para la lectura de los cromatogramas en formato ABI recibidos del Servicio de Genética Forense de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, los cuales fueron obtenidos de los productos amplificados por PCR. Con esta herramienta nos permitió determinar la calidad de las secuencias y la visualización de polimorfismos en las mismas. A su vez, con este programa, se descartaron las regiones iniciales y finales de las secuencias.

##### **2.2.12.2. Gene Runner (versión 3.0.1)**

Este programa fue empleado con el fin de obtener una secuencia consenso mediante el alineamiento de las parejas de secuencias obtenidas de cada producto amplificado por PCR. Dicha secuencia consenso nos sirvió para comprobar las posibles discrepancias que se pudiesen dar entre los pares de secuencias obtenidas por fragmento.

Gene Runner (versión 3.0.1) también nos permitió editar las secuencias finales para cada producto, estableciendo el inicio y el final para cada una de ellas en concordancia con los límites publicados para las ISR en el grupo *M. mycoides* (Harasawa y cols., 2000; Manso-Silván y cols., 2007; Thiaucourt y cols., 2000; Vilei y col., 2006).

### **2.2.12.3. Bioedit (versión 7.0.9)**

La alineación y comparación de las secuencias finales se llevó a cabo mediante la utilización de este programa (Thompson y cols. 1994). Bioedit también nos permitió observar diferencias de nucleótidos entre las secuencias analizadas y su posición relativa en gen estudiado.

A su vez, el programa Bioedit (versión 7.0.9) nos permitió comparar los segmentos obtenidos con la base de datos de secuencias gratuitas online GeneBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) usando la aplicación de alineamiento de secuencias local BLASTN 2.2.10, que también nos sirvió para la elaboración de tablas de homología comparada entre los diferentes patrones secuenciales (Altschul y cols., 1990; Altschul y cols., 1997).

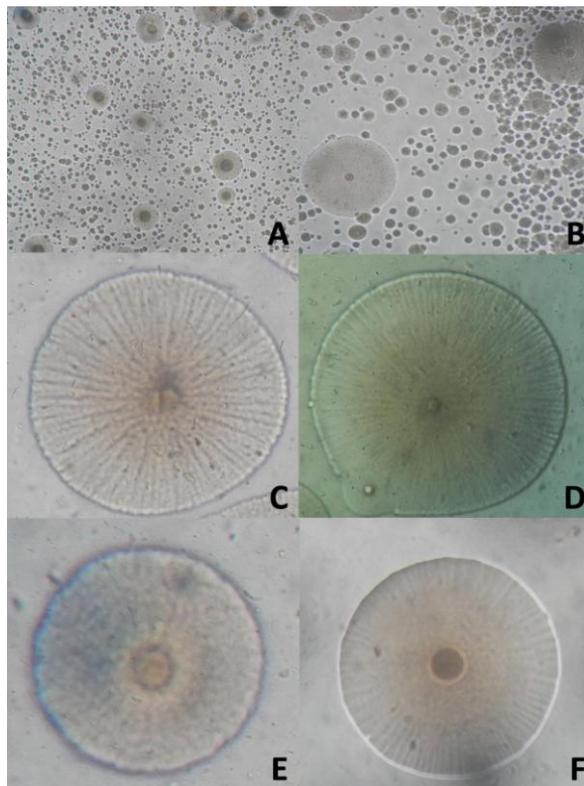
### **2.2.12.4. Mega (versión 5.0.3)**

Mega (versión 5.0.3) (Kumar y cols. 2004) fue empleado para la construcción de dendrogramas a partir de las secuencias alineadas. Con ello se pudo visualizar mediante esquemas ramificados la proximidad filogenética de las especies de micoplasmas secuenciados, usando como especie de referencia externa al grupo *M. mycoides*, a *M. agalactiae* cepa PG2.

## **2.3. Resultados**

### **2.3.1. Características de las colonias y perfil bioquímico y enzimático**

De todas las especies de micoplasmas reconstituidas desde los liofilizados, la única cuya morfología no pudo ser caracterizada, así como tampoco su perfil bioquímico y enzimático, fue la correspondiente con *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*, debido a que sus requerimientos nutricionales la hacen una especie de difícil crecimiento *in vitro*.



**Figura 2.3.** Ejemplos de colonias típicas de micoplasma observadas *in vitro*. A-Myeat, B-Mptr, C-Mmm, D-MmmLC, E-Mcot, F-Mmc.

Para el resto de micoplasmas se comprobó su crecimiento en medio líquido tras 48-96 horas tras la reconstitución, así como la visualización de colonias típicas de micoplasmas en forma de “huevo frito” en los medios de cultivo sólido, tras unas 24-72 horas en incubación a 37°C en los diferentes tipos de medios utilizados (**figura 2.3**).

Con respecto a la caracterización bioquímica y enzimática, aquellas especies cuyo crecimiento se realizó en medio ph, provocaron una turbidez del medio y, aquellas que precisaban de un enriquecimiento nutricional adicional, fueron cultivadas en medio SP4-II,

provocando en este medio un cambio de coloración. Las características de cada una de las cepas se pueden observar en la **tabla 2.9**.

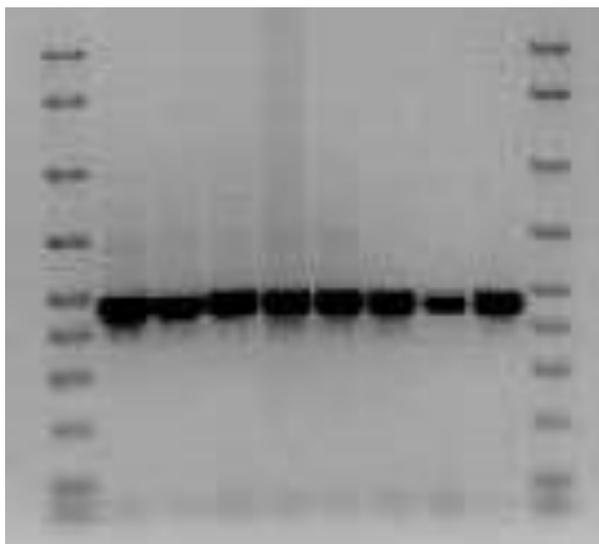
CEPAS	GLUCOSA	MANOSA	ARGININA	UREA	TETRAZOLIUM	P/C
Mmm	+	+	-	-	+	-
Mmc	+	+	-	-	+	-
MmmLC	+	+	-	-	+	-
Mcc	+	+	+	-	+	-
Mleach	+	+	-	-	-	-
Myeat	+	+	+	-	+	-
Mcot	+	+	-*	-	+	-
Mptr	+	+	-	-	+	+

**Tabla 2.9.** Resumen de resultados de las pruebas bioquímicas/enzimáticas. \*Se distingue un color diferente al negativo (control), pero sin llegar a tornar a positivo (amarillo). Esto suele ocurrir en micoplasmas fermentadores.

Las cepas de MmmLC, Mmmc, Mmm, Mcc, Mleach, Mptr, Myeat y Mcot fermentaron tanto la glucosa como la manosa, solo Myeat y Mcc hidrolizaron la arginina. En el caso de Mcot se observó un cambio de coloración en el medio de arginina, pero no fue considerada como coloración positiva, debido a que algunos micoplasmas fermentadores usan otros sustratos del medio provocando un cambio del pH del mismo y a su vez de la coloración, sin estar asociado al uso de la arginina. Ninguna cepa hidrolizó la urea, y la reducción de tetrazolium fue positiva para todas las cepas estudiadas. Solo la cepa de Mptr formó películas y cristales (P/C), siendo consistentes con las descripciones previas realizadas para este grupo de micoplasmas.

### 2.3.2. Extracción de ADN, PCR convencional y electroforesis

La electroforesis en gel de agarosa confirmó la presencia de un solo producto de PCR por cepa y gen diana estudiado, lo que confirmó la calidad del ADN extraído, además de demostrar que el clonaje de los cultivos fue exitoso, sin la presencia de cultivos mixtos y/o contaminación de los mismos. Un ejemplo de la evaluación de la amplificación de ADN por PCR convencional se puede observar en la **figura 2.4**.



**Figura 2.4.** Productos de PCR de la región intergénica entre los genes 16S y 23S ARNr. Orden de carga de muestras: Marcador de peso molecular, MmmLC, Mmm, Mmc, Mcca, Mleach, Mptr, Mcot, Myeat, Marcador de peso molecular. Cabe destacar la presencia de una sola banda y el tamaño similar de las mismas.

### 2.3.3. Control de calidad de los micoplasmas basado en el gen ARNr 16S

El control de calidad para secuenciación basado en el análisis del gen que codifica al ARNr 16S, y posterior búsqueda y comparación en la base de datos GeneBank mediante la aplicación BLASTN 2.2.10 de las diferentes especies manipuladas, confirmó que se trataban de las cepas de

referencia de cada uno de micoplasmas elegidos para el estudio y la calidad del ADN usado como base para este estudio.

Además, cabe destacar que en el caso de Mccp, debido a la dificultad de obtener un crecimiento óptimo de este microorganismo *in vitro*, su identificación se basó exclusivamente en la secuenciación de este gen, confirmando de forma inequívoca la identidad del ADN de este patógeno.

#### 2.3.4. Análisis de secuencias de la región intergénica 16S-23S ARNr

Las secuencias obtenidas a partir de la PCR de los micoplasmas a estudio demostraron un tamaño de región que osciló entre 228 y 272 pares de bases. La mayor similitud entre secuencias se encontró entre Myeat y Mcot, donde la homología alcanza el 100% (figura 2.5, tabla 2.11). Cabe destacar que no se observaron polimorfismos en ninguna de dichas especies, así como tampoco en Mptr. La mayor divergencia entre especies se encontró entre Mptr y Mccp, con una similitud de 84% (tabla 2.11).

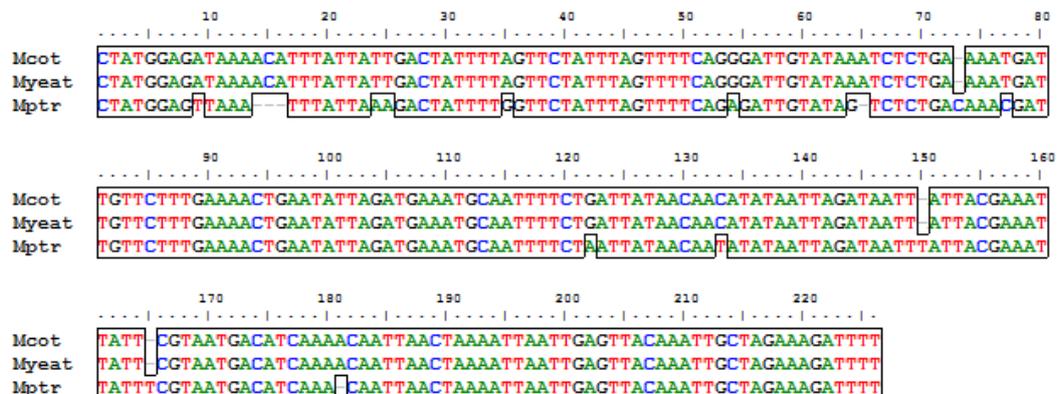
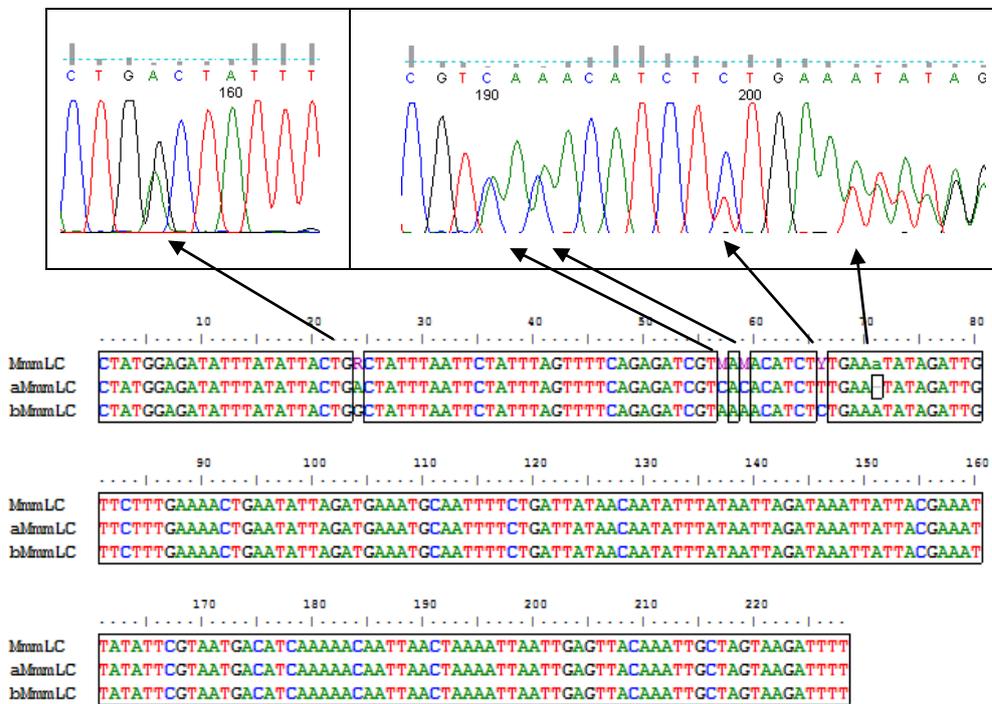


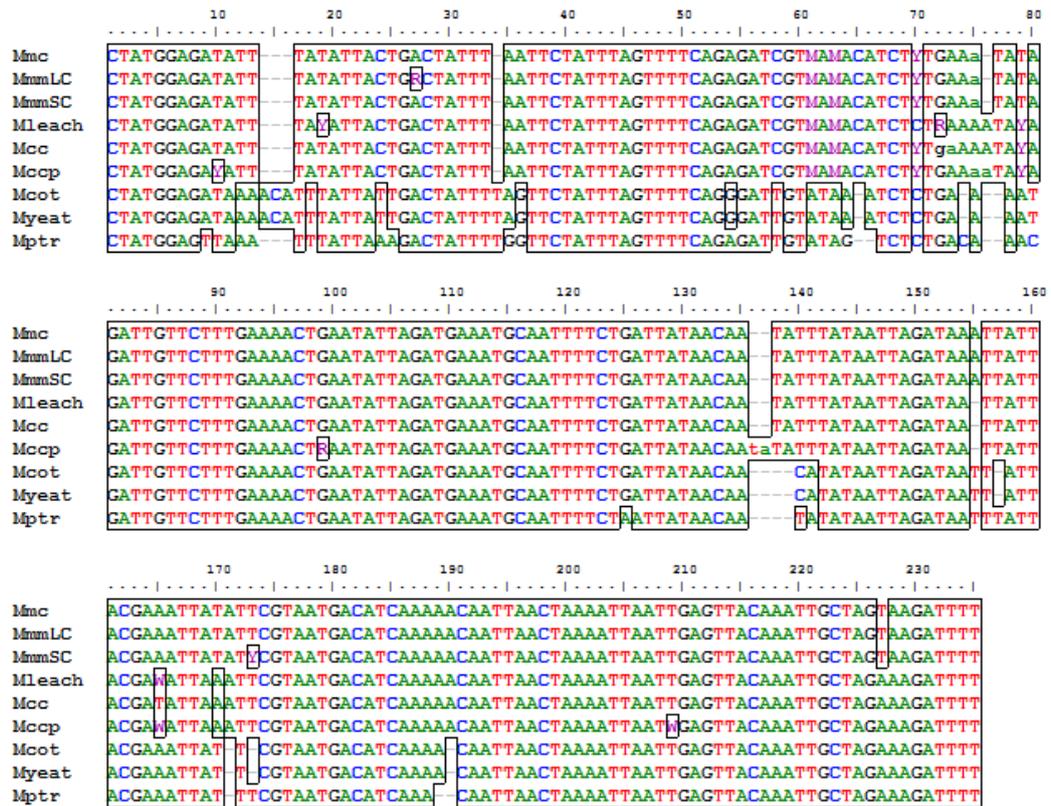
Figura 2.5. Secuencia comparativa de la región intergénica 16S-23S de *M. yeatsii*, *M. cottewii* y *M. putrefaciens*.

La única incongruencia hallada entre Mmm y Mmc en la ISR 16S-23S es el polimorfismo Y (C / T) que se encuentra en Mmm en el número de posición de nucleótido 167 (ver **figura 2.6**), el cual no existe en Mmc. (**tabla 2.10** y **figura 2.6**).



**Figura 2.6.** Ejemplo de alineamiento de la secuencia de la ISR 16S-23S ARNr consenso de MmmLC con las secuencias de los operones a y b. Mostrándose detalles de los cromatogramas de las posiciones con polimorfismos o doble secuenciación.

Existen algunas similitudes entre las diferentes cepas para los polimorfismos observados, así para Mmm, Mmc, MmmLC, Mcc y Mleach nos encontramos con que para las posiciones 57 y 59 se sustituye una A por una C (M), en la posición 66 hay una sustitución de una C por una T (Y), excepto para Mleach, donde ésta no existe, pero sí en la posición 68 se sustituye una G por un A (R), al igual que ocurre para Mcc.



**Figura 2.7.** Alineamiento de las secuencias de la región intergénica 16S-23S de todas las especies bacterianas a estudio en esta tesis. Y: C/T, R: A/G, W: A/T. Los nucleótidos en minúscula, se encuentran únicamente en uno de los operones.

Cepa	Nº nucleótido												
	10	16	24	66	68-72	75	95	132-133	151	161	169	205	225
Mmc	T	T	A	Y	GAAa-	T	G	--	A	A	T	T	T
MmmLC	T	T	R	Y	GAAa-	T	G	--	A	A	T	T	T
Mmm	T	T	A	Y	GAAa-	T	G	--	A	A	Y	T	T
Mleach	T	Y	A	C	RAAAA	Y	G	--	-	W	T	T	A
Mcc	T	T	A	Y	GaAAA	Y	G	--	-	T	T	T	A
Mccp	Y	T	A	Y	GAAaa	Y	R	Ta	-	W	T	W	A

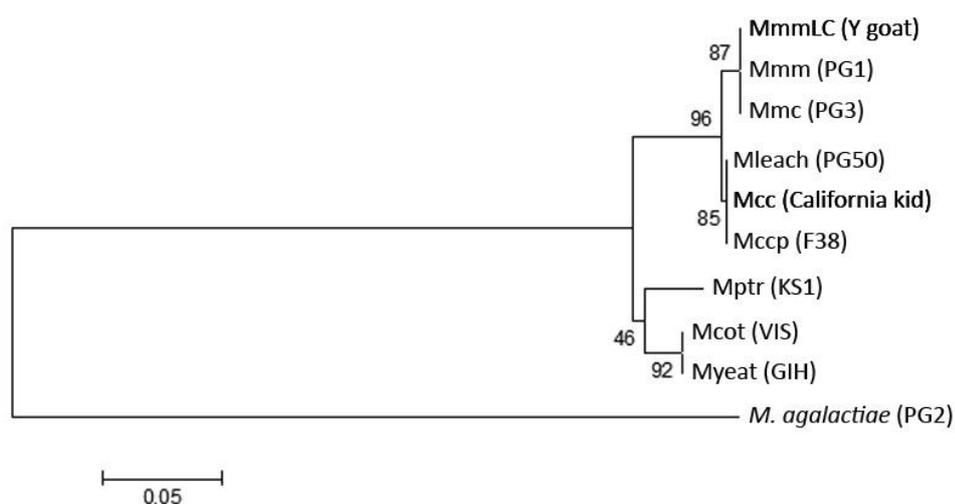
**Tabla 2.10.** Tabla resumen con las diferencias en las secuencias de la región intergénica 16S-23S de *M. mycoides* subsp *capri*, *M. mycoides* subsp *mycoides* SC, *M. mycoides* subsp *mycoides* LC y *M. capricolum* subsp *capricolum* y *M. leachii*. La numeración se corresponde con las secuencias de la figura 2.5. Y: C/T, R: A/G, W: A/T. los nucleótidos en minúscula, se encuentran únicamente en uno de los operones.

	Mmc	MmmLC	Mmm	Mleach	Mcc	Mccp	Mcot	Myeat	Mptr
--	-----	-------	-----	--------	-----	------	------	-------	------

<b>Mmc</b>	ID	0,995	0,995	0,960	0,973	0,952	0,870	0,870	0,868
<b>MmmLC</b>	0,995	ID	0,991	0,956	0,969	0,948	0,866	0,866	0,864
<b>Mmm</b>	0,995	0,991	ID	0,956	0,969	0,948	0,870	0,870	0,864
<b>Mleach</b>	0,960	0,956	0,956	ID	0,982	0,965	0,858	0,858	0,856
<b>Mcc</b>	0,973	0,969	0,969	0,982	ID	0,973	0,862	0,862	0,860
<b>Mccp</b>	0,952	0,948	0,948	0,965	0,973	ID	0,842	0,842	0,840
<b>Mcot</b>	0,870	0,866	0,870	0,858	0,862	0,842	ID	1,000	0,924
<b>Myeat</b>	0,870	0,866	0,870	0,858	0,862	0,842	1,000	ID	0,924
<b>Mptr</b>	0,868	0,864	0,864	0,856	0,860	0,840	0,924	0,924	ID

**Tabla 2.11.** Porcentajes de similitud entre secuencias de la ISR 16S-23S. Las celdas sombreadas en rojo corresponden al menor valor de similitud detectado. Las celdas sombreadas en azul corresponden a los mayores valores de similitud detectados.

En cuanto al análisis filogenéticos basado en 16S-23S ISR de las cepas estudiadas (**figura 2.8**), presenta dos grandes divisiones. En primer lugar, se observa una división que incluye a las especies de micoplasma presentes en el grupo *M. mycoides*, donde a su vez se demuestra la existencia de dos subgrupos dentro del grupo *M. mycoides*.



**Figura 2.8.** Árbol filogenético obtenido tras el análisis de secuencias de la región intergénica basado en 16S-23S ARNr de las especies bajo estudio. *Mycoplasma agalactiae* PG2 se usó para el análisis con secuencia externa.

Uno de ellos se encuentra formado por los micoplasmas: Mcc, Mccp y Mleach. La otra gran división observada por medio del análisis filogenético en el grupo *M. mycoides* lo conforman las cepas Mmm, MmmLC y Mmc, con secuencias idénticas basadas en el análisis de la ISR 16S-23S. La segunda gran división, separada filogenéticamente del grupo *M. mycoides* la forman Mptr, Mcot y Myeat, donde Myeat y Mcot se agrupan de forma idéntica debido a la similitud de sus secuencias.

### 2.3.5. Análisis de secuencias del gen 23S ARNr

La longitud media del gen 23S ARNr en las cepas estudiadas es de 2891 pares de bases. En términos de similitud entre cepas, el porcentaje de similitud más bajo observado fue de un 95.2% entre Mccp y Mptr y entre Mmm y Mptr. Los porcentajes más altos de similitud fue el hallado entre Mcot y Myeat y MmmLC y Mmc, con 99.6% de similitud en ambos casos (**tabla 2.12**). En el anexo 1 se pueden encontrar la representación completa del alineamiento del gen 23S.

	Ma	Mcc	Mmc	Mcot	Mccp	MmmLC	Mleach	Mptr	Mmm	Myeat
Ma	ID	0,768	0,768	0,769	0,766	0,770	0,768	0,764	0,767	0,770
Mcc	0,768	ID	0,984	0,966	0,992	0,985	0,993	0,955	0,981	0,965
Mmc	0,768	0,984	ID	0,965	0,980	0,996	0,983	0,954	0,993	0,965
Mcot	0,769	0,966	0,965	ID	0,961	0,966	0,963	0,967	0,963	0,996
Mccp	0,766	0,992	0,980	0,961	ID	0,981	0,987	0,952	0,977	0,960
MmmLC	0,770	0,985	0,996	0,966	0,981	ID	0,983	0,956	0,993	0,966
Mleach	0,768	0,993	0,983	0,963	0,987	0,983	ID	0,953	0,979	0,963
Mptr	0,764	0,955	0,954	0,967	0,952	0,956	0,953	ID	0,952	0,967
Mmm	0,767	0,981	0,993	0,963	0,977	0,993	0,979	0,952	ID	0,962
Myeat	0,770	0,965	0,965	0,996	0,960	0,966	0,963	0,967	0,962	ID

**Tabla 2.12.** Porcentajes de similitud entre secuencias del gen 23S ARNr. Las celdas sombreadas en rojo corresponden al menor valor de similitud detectado. Las celdas sombreadas en azul corresponden a los mayores valores de similitud detectados.

En cuanto a los polimorfismos hallados, se encontraron algunas similitudes entre especies, obteniéndose una R para Mmc, MmmLC y Mleach en la posición 161, un polimorfismo que vemos repetido en las posiciones 278 y 287 compartidos por Mleach, Mcot y Myeat y por Mleach y Myeat respectivamente. En la posición 289, el polimorfismo Y se repite para Mcot y Myeat y en la 2875 para Mleach y Mptr. En las posiciones 307, 309 y 310 observamos K, W y M respectivamente, presentes en Mmc y Mmm en los tres casos (tabla 2.13).

Cepa	Posición (numeración correspondiente a pares de bases)							
	161	278	287	289	307	309	310	2872
<b>Mmmc</b>	R	A	A	T	K	W	M	T
<b>MmmLC</b>	R	A	A	T	T	A	A	T
<b>Mmm</b>	A	A	A	T	K	W	M	T
<b>Mcc</b>	G	A	G	T	G	T	C	T
<b>Mccp</b>	G	A	G	T	G	T	C	T
<b>Mleach</b>	R	R	R	T	G	T	Y	Y
<b>Mcot</b>	G	R	G	Y	G	T	A	T
<b>Myeat</b>	G	R	R	Y	G	T	A	T
<b>Mptr</b>	C	A	G	T	G	T	A	Y

**Tabla 2.13.** Tabla resumen con los polimorfismos encontrados en el gen 23S ARNr tras comparación de las cepas en estudio.

El análisis filogenético inferido a partir de las secuencias del gen 23S ARNr (figura 2.9) demuestra una distribución similar a la observada anteriormente tras el análisis de la ISR 16S-23S. De nuevo se observaron dos grandes divisiones, incluyendo por un lado a los micoplasma englobados dentro del grupo *M. mycoides* y por otro lado a Mptr, Mcot y Myeat.

Dentro del grupo *M. mycoides* se observa a su vez una clara subdivisión que incluye a Mcc, Mcc y Mleach, formando un subgrupo filogenético dentro del grupo y otra subdivisión formada por Mmc, MmmLC y Mmm. No se observaron diferencias entre las cepas de los

subgrupos del grupo *M. mycoides*, a diferencia de lo observado tras analizar el árbol filogenético obtenido a partir de las secuencias de la ISR 16S-23S.

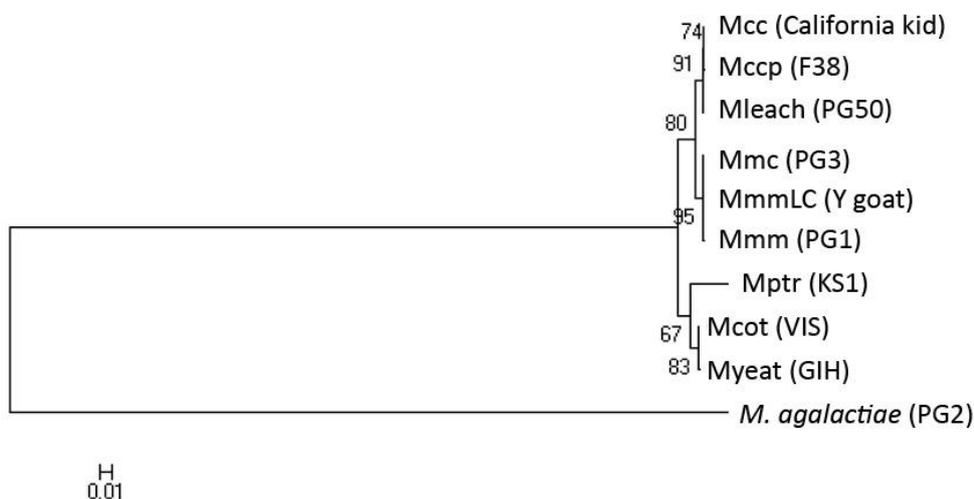


Figura 2.9. Árbol filogenético obtenido a partir de secuencias del gen 23S ARNr.

### 2.3.6. Análisis de secuencias de la región intergénica 23S-5S ARNr

Las secuencias de la ISR 23S-5S ARNr del grupo *M. mycoides*, *Mcot*, *Myeat* y *Mptra* se muestran en la **figura 2.10**.

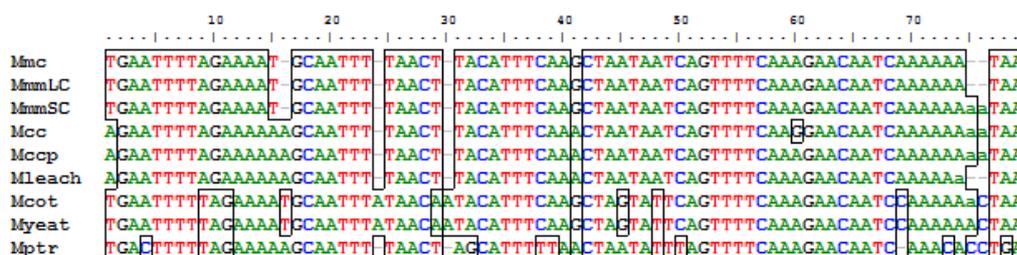


Figura 2.10. Alineamiento de las secuencias de los miembros del grupo *M. mycoides*, *Mcot*, *Myeat* y *Mptra* de la región intergénica entre los genes 23S y 5S ARNr. Los nucleótidos en minúscula, se encuentran únicamente en uno de los operones.

Nº de nucleótidos																
Cepa	1	4	15	16	24	30	31	32	38	39	41	45	47	50	60	69-74
<b>Mmc</b>	T	A	T	-	-	-	T	A	A	A	G	A	A	C	A	AAAAAA--TA
<b>MmmLC</b>	T	A	T	-	-	-	T	A	A	A	G	A	A	C	A	AAAAAA--TA
<b>Mmm</b>	T	A	T	-	-	-	T	A	A	A	G	A	A	C	A	AAAAAAaTA
<b>Mcc</b>	A	A	A	A	-	-	T	A	A	A	A	A	A	C	G	AAAAAAaTA
<b>Mccp</b>	A	A	A	A	-	-	T	A	A	A	A	A	A	C	A	AAAAAAaTA
<b>Mleach</b>	A	A	A	A	-	-	T	A	A	A	A	A	A	C	A	AAAAAa--TA
<b>Mcot</b>	T	A	A	T	A	A	T	A	A	A	G	G	T	C	A	CAAAAAaCTA
<b>Myeat</b>	T	A	A	T	A	A	T	A	A	A	G	G	T	C	A	CAAAAAaCTA
<b>Mptr</b>	T	C	A	A	-	-	A	G	T	T	A	A	T	T	A	-AAACACCTG

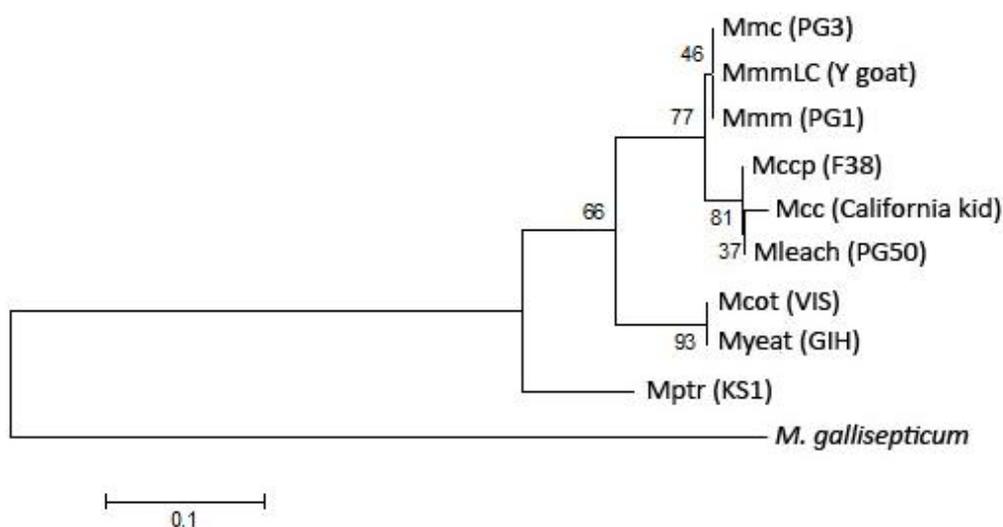
**Tabla 2.14.** Tabla resumen con las diferencias en las secuencias de la región intergénica 16S-23S de las especies pertenecientes al grupo *M. mycoides*, Mcot, Myeat y Mptr. Los nucleótidos en minúscula, se encuentran únicamente en uno de los operones.

El tamaño total de la secuencia correspondiente a la ISR 23S-5S es de 79 pb. La mayor entre especies de micoplasmas se encontró entre Mmc y MmmLC (100%), seguida por Mccp y Mcc (98,7%). Las mayores diferencias se encontraron entre Mptr y las siguientes especies: Mmc, MmmLC y Mmm (76,6%).

	Mmc	MmmLC	Mmm	Mcc	Mccp	Mleach	Mcot	Myeat	Mptr
<b>Mmc</b>	ID	1,000	0,973	0,909	0,922	0,946	0,835	0,835	0,766
<b>MmmLC</b>	1,000	ID	0,973	0,909	0,922	0,946	0,835	0,835	0,766
<b>Mmm</b>	0,973	0,973	ID	0,935	0,948	0,922	0,848	0,848	0,766
<b>Mcc</b>	0,909	0,909	0,935	ID	0,987	0,961	0,822	0,822	0,779
<b>Mccp</b>	0,922	0,922	0,948	0,987	ID	0,974	0,835	0,835	0,792
<b>Mleach</b>	0,946	0,946	0,922	0,961	0,974	ID	0,822	0,822	0,792
<b>Mcot</b>	0,835	0,835	0,848	0,822	0,835	0,822	ID	1,000	0,797
<b>Myeat</b>	0,835	0,835	0,848	0,822	0,835	0,822	1,000	ID	0,797
<b>Mptr</b>	0,766	0,766	0,766	0,779	0,792	0,792	0,797	0,797	ID

**Tabla 2.15.** Similitudes entre las diferentes cepas de los miembros del grupo *M. mycoides* y micoplasmas relacionados al comparar las secuencias de la ISR entre los genes 23S y 5S ARNr.

La **figura 2.11** representa un árbol filogenético obtenido a partir de las secuencias de las ISR 23S-5S con todas las especies en estudio. Usando este gen como diana, Mptr presentó una mayor divergencia en relación a todas las otras cepas analizadas, agrupándose de forma externa a Mcot y Myeat y al grupo *M. mycoides*. Mmc, MmmLC y Mmm se agruparon de forma indiferenciable en un subgrupo dentro del grupo *M. mycoides*. Otra rama dentro de este grupo engloba a Mccp, Mcc y Mleach, en este caso con diferencias entre ellos. Mcot y Myeat se agruparon externamente al grupo *M. mycoides*, sin que se pudieran observar diferencias entre ambas especies.

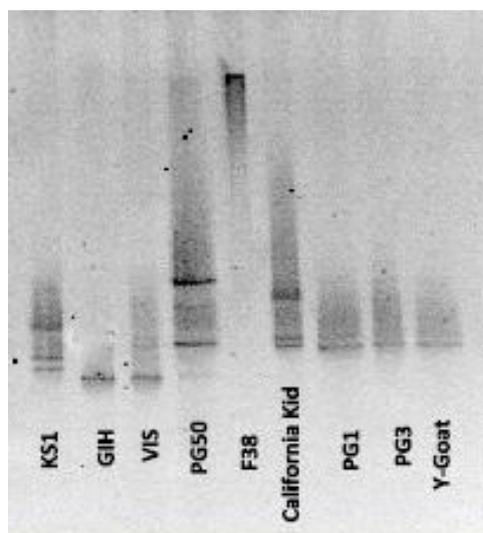


**Figura 2.11.** Dendrograma obtenido con el análisis de las secuencias de las regiones entre los genes 23S y 5S ARNr. *Mycoplasma gallisepticum* actúa como grupo de referencia externo.

### 2.3.7. Resultados DGGE para la región intergénica 16S-23S

Los resultados para la ISR 16S-23S se puede observar en la **figura 2.12** De izquierda a derecha se observan las bandas correspondientes a Mptr (KS1), Myeat (GIH), Mcot (VIS), Mleach (PG50), Mcc (California kid), Mmm (PG1), Mmc (PG3) y MmmLC (cepa Y goat) respectivamente. No se obtuvo resultado para la cepa F38 de Mccp, ya que, aunque se pudo confirmar la

amplificación del fragmento de la ISR 16S-23S de este micoplasma en gel de agarosa, no se observó amplificación aparente en el gel de acrilamida. Mmm (PG1), MmmLC (Y goat) y Mmc (PG3) presentaron un patrón indistinguible de bandas de DGGE basadas en la ISR 16S-23S. De la misma manera no se observaron diferencias entre las especies Mcot (VIS), Myeat (GIH). Sin embargo, las especies Mptr (KS1), Mleach (PG50) y Mcc (California kid) presentaron patrones de bandas únicos y claramente distinguibles del resto de las especies estudiadas.



**Figura 2.12.** Gel de poliacrilamida de DGGE obtenido tras amplificar la región intergénica 16S-23S ARNr de las especies bajo estudio (Mptr (KS1), Myeat (GIH), Mcot (VIS), Mleach (PG50), Mccp (F38), Mcc (California kid), Mmm (PG1), Mmc (PG3) y MmmLC (cepa Y goat)).

#### 2.4. Discusión

En cuanto a la morfología de las colonias, así como a la caracterización bioquímica y enzimática, nuestros resultados concuerdan con lo descrito previamente por diferentes autores en relación a los micoplasmas objeto de este estudio (Tully y cols. 1974; Leach y cols. 1993; Damassa y cols. 1994; Abu-Groun y cols. 1994; Manso-Silván y cols. 2009).

Cabe citar que Mccp es considerado uno de los micoplasmas más exigentes en cuanto a su crecimiento *in vitro* y de difícil aislamiento (Leach y cols. 1993; Manso-Silván y cols. 2011), por ello su diagnóstico fue basado únicamente en base a la secuenciación del gen que codifica al ARNr 16S, sabiendo que la técnica de PCR como método identificativo es particularmente útil para aquellos agentes patógenos que son de difícil cultivo *in vitro* o requieren un período de cultivo largo, tales como *M. dispar*, *M. conjunctivae* o *Ureaplasma* spp. entre otros (Nicholas y cols., 2008). Además, al tratarse de un patógeno, al igual que Mmm, clasificado como de declaración obligatoria por la organización mundial de la sanidad animal, y del que España está declarada como libre de manera oficial, su cultivo *in vitro* se ve limitado a aquellos laboratorios con medidas de bioseguridad de nivel 2 o 3 dependiendo de la legislación vigente, por lo que el uso de técnicas basadas en biología molecular supone en muchos casos la única alternativa posible para su detección y estudio.

La técnica de PCR, por si sola o en combinación con secuenciación, es considerada como uno de los métodos más rápidos y sensibles para la detección de patógenos infecciosos en especímenes clínicos. La técnica de PCR junto con secuenciación es particularmente útil para la detección y diferenciación de miembros del grupo *M. mycoides*, los cuales son de difícil o imposible diferenciación usando los métodos tradicionales de cultivo y técnicas serológicas debido a alto nivel de similitud fenotípica (Nicholas y cols, 2008). Para nuestro estudio, el control de calidad, realizado mediante secuenciación del gen ARNr 16S, fue concluyente para la identificación final de cada una de las especies de micoplasmas analizadas, proporcionando unos resultados de entre 99.9% y 100% de homología para las especies estudiadas (Heldtander y cols. 1998; Pettersson y cols. 1996). Esto hecho demuestra que en situaciones donde se trabaja con

especies bacterianas altamente similares, como es el caso del grupo *M. mycoides*, el uso de una técnica de confirmatoria de alta especificidad, tal como la secuenciación ARNr 16S, es esencial.

Aunque el gen ARNr 16S, 23S y regiones intergénicas fueron considerada inicialmente como "ADN chatarra" ("junk DNA"), debido a que se agrupa dentro del llamado ADN no codificante, su concepción actual e importancia desde un punto de vista evolutivo y carácter universal en procariotas, lo posicionan como uno de los genes más utilizados en estudios filogenéticos. Estas regiones conservativas han sido descritas y ampliamente utilizadas para caracterizar mollicutes (Harasawa y cols., 1992; Harasawa, 1999; Harasawa y Kanamoto, 1999; Harasawa y cols., 2000; Harasawa y cols., 2004).

Históricamente, la filogenia del grupo *M. mycoides* ha centrado grandes esfuerzos dentro el campo de la investigación en micoplasmología. Algunos autores han sugerido que la aclaración de la filogenia del grupo *M. mycoides* mediante la secuenciación del gen que codifica al ARNr 16S resulta insuficiente, por lo que se han evaluado otras regiones, como la región intergénica 16S-23S ARNr o regiones conservadas de genes constitutivos, para resolver las relaciones evolutivas entre los diferentes miembros de este grupo y mollicutes en general (Manoso-Silván y cols. 2009; Volokhov y cols. 2012). En lo que respecta al análisis del gen ARNr 23S, aunque desde el punto de vista filogenético ha perdido relevancia en favor del análisis del gen ARNr 16S (Pei y cols., 2009), las mejoras en las tecnologías de secuenciación y el desarrollo de protocolos estandarizados de secuenciación de este gen (Hunt y cols., 2006), además de ciertas características específicas tales como mayor longitud, inserciones/delecciones únicas y mayor resolución debido a una mayor

variabilidad genética (Ludwig y Schleifer, 1994), hacen que sea de interés para el estudio de filogenia en micoplasmas.

Harasawa y colaboradores (2000) describieron una filogenia del grupo *M. mycoides* basada en la región intergénica 16S-23S. El análisis realizado por estos autores demuestra una distribución similar a lo descrito por otros autores (Pettersson y cols. 1996; Thiaucourt y cols. 2000; Manso-Silván y cols. 2007). Sin embargo, llama la atención que en el análisis realizado por Harasawa y colaboradores, las cepas de Mmc (PG3) y Mmm (PG1), agrupan como especies idénticas, mientras MmmLC (Y goat), una especie actualmente unificada en una misma especie junto con Mmc, se agrupa de forma independiente en este subgrupo. Estas diferencias se pueden explicar debido a la presencia de dos operones del ARN ribosómico (*rrnA* y *rrnB*) en los micoplasmas del grupo *M. mycoides*, que pueden presentar polimorfismos entre ellos e incluso diferente tamaño (Pettersson y cols., 1996). En nuestro estudio, se observa una similitud de 99,5% entre Mmc y MmmLC, y entre Mmm y Mmc, siendo de 99,1% entre Mmm y MmmLC, sin que los miembros de este subgrupo dentro del dendrograma del grupo *M. mycoides* se diferencien en gran medida entre ellos.

La similitud que muestran *M. yeatsii* y *M. cottewii* entre sí para la ISR 16S-23S es de un 100%, además de la ausencia de polimorfismos en esta región secuenciada. No siendo así para el gen que codifica el ARNr 16S, donde dicha similitud alcanza un valor del 99.7% (4 nucleótidos de diferencia en nuestro estudio) y donde se puede encontrar la presencia de un polimorfismo en *M. yeatsii* (Heldtander y cols., 1998). Este es un ejemplo de las limitaciones de la ISR 16S-23S en el estudio filogenético del grupo *M. mycoides* y especies cercanas, aunque por lo general la

distribución de las especies observada es similar a la presente cuando se usa el gen 16S ARNr como referencia.

Basándonos en la información obtenida a partir del dendrograma elaborado con las secuencias obtenidas de la ISR 16S-23S ARNr y gen ARNr 23S se observa una distribución similar de los aislados. En primer lugar, el grupo *M. mycoides* se divide en dos subgrupos, uno formado por las especies Mmm (PG1), Mmc (PG3) y MmmLC (Y-goat) y otro formado por las especies Mcc (California Kid), Mccp (F38) y Mleach (PG50). Fuera del grupo *M. mycoides*, Mcot (VIS) y Myeat (GIH) agruparon de forma muy próxima, siendo Mptr (KS1) la especie más divergente en relación al resto de las especies analizadas en ambos casos. La distribución observada es idéntica a la vista por otros autores, tales como Manso-Silván y colaboradores (2007), en un análisis filogenético del grupo *M. mycoides* inferido a partir de secuencias parciales y concatenadas de genes conservativos (*fusA*, *glpQ*, *gyrB*, *lepA* y *rpoB*).

En el análisis obtenido a partir de la región intergénica 23S-5S, se obtuvo la distribución de especies, basadas en el árbol filogenético, más divergente en comparación con las distribuciones observadas tras el análisis del gen ARNr 26S, 23S y de la ISR 16S-23S. Usando esta región, la distribución de las especies presentes en el grupo *M. mycoides*, de Mcot y de Myeat es similar a la observada anteriormente en las otras dos dianas genéticas. Sin embargo, es con Mptr donde se produce un agrupamiento contrario al establecido anteriormente, presentándose de forma externa a todas las demás especies estudiadas, demostrado por la menor similitud obtenida en todos los análisis filogenéticos realizados en esta tesis, con una similitud mínima de 76,6%.

Esta falta de congruencia con los resultados de las otras secuencias diana se basa principalmente al tamaño de esta secuencia (79 pb), lo que reduce el poder discriminatorio del análisis de secuencias de esta región intergénica.

Basado en el análisis realizado en esta tesis, la mayor variabilidad entre especies se encontró en la ISR 23S-5S (mínimo 76,6% - máximo 100%, variabilidad general: 23,4%), seguida de la ISR 16S-23S (mínimo 84% - máximo 100%, variabilidad general: 16%) y por último del gen - ARNr 23S (mínimo 95,2% - máximo 99,6%, variabilidad general: 4,4%). Esta variabilidad sugiere que caso de realizar estudios filoevolutivos inferidos a partir de secuencias genéticas de estas tres regiones, el gen ARNr 23S sería la región de elección, ya que los cambios observados, al ser un región más conservada, se pueden atribuir en mayor medida a procesos evolutivos, a diferencias de las regiones intergénica, donde esa mayor variabilidad observada puede atribuirse no solo a cambio evolutivos, sino también a procesos espontáneos no relacionada a evolución de las especies en cuestión.

A pesar de esto, la ISR 16S-23S debe ser considerada como una herramienta útil para el estudio de filogenia de micoplasmas y del grupo *M. mycoides*. La evidencia demuestra que su uso puede ser de gran utilidad para completar estudios basados en gen ARNr 16S (Volkhov y cols., 2012) y estudios clínicos de prevalencia en especies animales (Tamiozsoa y cols., 2014), ya que presenta la ventaja de tener un buen poder de discriminación y la facilidad y rapidez de uso, al necesitarse sólo un juego de primers para obtener el fragmento a secuenciar, por lo que además resulta relativamente económico en relación a otras dianas usadas para estudios filogenéticos, tales como el gen 16S ARNr y el gen 23S ARNr.

Una de las principales razones para el estudio del ARN ribosomal en investigación aplicada a micoplasmas, a parte del uso de la información de secuencias para estudios filogenéticos, es el desarrollo de técnicas diagnósticas basadas en PCR (Bascuñana y cols., 1994; Stradaioli y cols., 1999) o variaciones diagnósticas tales como la PCR/DGGE (Mcauliffe y cols., 2003; Mcauliffe y cols., 2005; Tardy y cols., 2009). Debido a la naturaleza conservativa de estas regiones del ARN ribosomal, en particular del gen ARNr 16S y 23S, el diseño de primers o cebadores dirigidos a estas regiones requiere un gran trabajo analítico para obtener primers específicos. Además, existe un gran riesgo de falsos positivos al usar estas secuencias de ADN como diana debido a la alta similitud entre especies bacterianas en algunas regiones, por lo que en la actualidad se tiende a buscar genes con secuencias únicas, tales como adhesinas o hemaglutininas (Mardassi y col., 2005; Marois y cols., 2010). Sin embargo, la PCR combinada con DGGE ha demostrado ser de gran utilidad para el estudio de microorganismos de la clase *Mollicutes* (Mcauliffe y cols., 2003). Esta técnica permite la discriminación de diferentes especies de micoplasmas al detectar el producto amplificado por PCR por la detección en geles de poliacrilamina con gradiente denaturante. Al observarse un patrón de bandas específico de especie, se facilita diferenciar cada especie de micoplasma, evitando así las posibles amplificaciones inespecíficas obtenidas en PCR convencional, donde sólo un fragmento de ADN amplificado suele ser observado.

En esta tesis se procedió a la evaluación de la ISR 16S-23S en combinación con la tecnología PCR/DGGE como potencial estrategia diagnóstica para micoplasmas del grupo *M. mycoides*, siendo una diana genética diferente a la usada hasta la fecha para la detección de especies del género *Mycoplasma*, que estaba basada en el análisis del gen 16S.

La región amplificada correspondiente al gen ARNr produce patrones de bandas indistinguibles para ciertas especies del grupo *M. mycoides* y micoplasmas relacionados. A pesar de ser un solo test específico que permite detectar diferentes micoplasmas usando un único juego de primers, siguiendo la metodología descrita por Mcauliffe y colaboradores (2003) y Tardy y colaboradores (2009), los siguientes micoplasmas del grupo *M. mycoides* y similares presentan un patrón indistinguible:

- Mleach, Mmm, Mmc y MmmLC
- Mccp y Mcc
- Mcot y Myeat

En nuestro estudio decidimos utilizar una región más variable, la ISR 16S-23S, con el fin de evaluar si la mayor variabilidad observada en sus secuencias en comparación con las del gen ARNr 16S, se corresponderían a su vez con una mayor capacidad discriminatoria cuando se aplica a una técnica diagnóstica tal como la PCR/DGGE.

Por lo general, los datos obtenidos usando la ISR 16S-23S se corresponden con los descritos con anterioridad para Mmm, Mmc, MmmLC, Mcc, Mccp y Mcot y Myeat. Sin embargo, Mleach, agrupado junto a Mmm, Mmc y MmmLC en análisis basados en el gen ARNr 16S (Tardy y cols., 2009), en este caso presenta un patrón de bandas único y que permite la diferenciación inequívoca de este microorganismo, lo que demuestra la mayor capacidad discriminatoria de esta diana genética para el diagnóstico de infecciones causadas por micoplasmas pertenecientes al grupo *M. mycoides* o aquellos estrechamente relacionados, por lo que puede considerarse como una potencial alternativa al uso del gen ARNr 16S en diagnóstico por DGGE, mejorando su

especificidad, aunque debería evaluarse usando un panel de micoplasma representativo para demostrar esta mayor especificidad de forma definitiva.

Los estudios llevados a cabo en este capítulo demuestran la utilidad del gen ARNr 23S para el estudio filogenético de micoplasma del grupo *M. mycoides* y relacionados, que puede ser combinado con el análisis de las secuencias de la ISR 16S-23S, debido a su utilidad en estudios evolutivos y bajo coste y facilidad de realización, aunque por lo general, las regiones intergénicas, al ser más variables, resultan secundarias en análisis filogenéticos frente a aquellas regiones conservativas como los genes 16S y 23S ARNr, pero deben ser consideradas como dianas diagnósticas potenciales para el desarrollo de PCRs y otros tests diagnósticos específicos (Ramírez y cols., 2007).

## **Capítulo 2 – Anexos**

---



## Anexo 2.1. Medios y reactivos empleados

### Medios de aislamiento.

Los medios de cultivo utilizados para la realización de este estudio fueron el SP4- II (Ramírez y cols., 1997) y el PH (Kirchhoff & Rosengarten, 1984). La composición y el modo de preparación fue el siguiente:

Medio SP4-II		
<b>Fase A</b>	Bacto PPLO broth	4,2 g
	Bacto peptona	6,4 g
	Bacto tryptona	12,0 g
	Agua destilada	535,0 ml
Se ajustó el pH a 7,8 y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos.		
Para el medio sólido se incluyeron en esta fase, 7,0 g de agarosa.		
<b>Fase B</b>	Extracto fresco de levadura (25% p/v) (1)	42,0 ml
	Solución de ampicilina (100 mg/ml)	2,5 ml
	Solución de extracto de levadura (5g/250ml)	120,0 ml
	Solución de DNA (0,4% p/v)	5,5 ml
	Piruvato sódico	2,5 ml
	B-NAD	0,125 g
	L-cisteína hidrocloreídica	0,125 g
	CMRL 1066 (10X)	60,0 ml
	Solución de rojo fenol (0,1%)	24,0 ml
	Agua bidestilada	207,5 ml
Se ajustó a pH: 7,2. Se prefiltró a través de papel de filtro y se filtró por membrana Millipore de 0,22 micrómetros.		
<b>Fase C</b>	Suero de caballo estéril inactivado (2)	251,0 ml
Asépticamente se agregó a la fase A, las fases B y C. El medio líquido se distribuyó en tubos estériles de 5 ml, a razón de 2 ml/tubo y se guardaron a -20°C hasta su uso. En el caso de medio sólido, antes de mezclar las tres fases se atemperaron a 45°C, para distribuirse inmediatamente después de mezclarse en placas de Petri estériles de 15 mm de diámetro, las cuales se conservaron a 4°C.		

Medio PH	
<b>Fase A</b>	
Bacto PPLO broth	16,80 g
Agua destilada	700 ml
Se ajustó el pH a 7,4 y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 30 minutos.	
Para el medio sólido se incluyeron en esta fase 28 g de Bacto PPLO agar, en vez de Bacto PPLO Broth.	
<b>Fase B</b>	
Extracto fresco de levadura (25% p/v) <b>(1)</b>	18 ml
Solución de penicilina G (100.000 UI/ml)	6 ml
Solución de DNA (0,4% p/v)	4,40 ml
B-NAD	0,10 g
L-cisteína hidrocloreídica	0,10 g
Agua bidestilada	91 ml
Se ajustó a pH: 7,4 y se filtró por membrana Millipore de 0,22 micrómetros.	
<b>Fase C</b>	
Suero de caballo estéril inactivado <b>(2)</b>	178 ml
Asépticamente se agregó a la fase A, las fases B y C. El medio líquido se distribuyó en tubos estériles de 5 ml, a razón de 2 ml/tubo y se guardó a -20°C hasta su uso. En el caso de medio sólido, antes de mezclar las tres fases se atemperaron a 45°C, para distribuirse inmediatamente después de mezclarse en placas de Petri estériles de 15 mm de diámetro, las cuales se conservaron a 4°C.	

**(1).** Preparación del extracto de levadura al 25 % p/v: *{Saccharomyces cerevisiae}*: En un baño atemperado a 45°C se calentaron 500 ml de agua bidestilada. Se añadieron 500 g de levadura de panadería fresca en pequeños fragmentos y se aumentó la temperatura del baño a 80°C durante 90 minutos. Se retiró la solución del baño y se depositó en agua fría durante aproximadamente 15 minutos. Transcurrido este tiempo, y con ácido clorhídrico concentrado se ajustó el pH a 4,5. Se mantuvo la suspensión a la misma temperatura durante 30 minutos más. Se centrifugó dicha

suspensión a 3.000 g durante 30 minutos, se recogió el sobrenadante y se añadió el mismo volumen de agua bidestilada. Por último, se filtró por filtros de diámetro de poro de 0,22 µm en condiciones estériles.

**(2).** Inactivación del suero de caballo: Se calentó el suero de caballo (descongelado) en un baño de temperatura a 56°C durante 30 minutos y se conservó el suero descomplementado a -20°C.

**Medios para la identificación bioquímica de micoplasmas.**

Todos los componentes de los medios para determinar la bioquímica de las diferentes cepas se esterilizaron antes de mezclarse y se conservaron a -20°C. La solución de HIB (Heart infusión broth) y la de HIA (Heart infusion agar) se esterilizaron 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 ajustó al pH adecuado y se esterilizó por filtración (0,20 µm). Los medios líquidos fueron distribuidos en tubos de plástico estériles a razón de 2 ml por tubo y se congelaron hasta su uso.

Medio líquido estándar (20% de suero)	
Solución de HIB (2,5% p/v)	296 ml
Solución de DNA (0,2% p/v)	4 ml
Suero de caballo inactivado	80 ml
Solución extracto de levadura (10%p/v)	20 ml
pH final: 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 2,3,5-trifeniltetrazolium (2% p/v)	20 ml
pH final: 7,6	

Medio para la prueba de la hidrólisis de la 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 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 final: 7,0	

Medio para la prueba de la hidrólisis de la 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 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 final: 7,0	

Medio para la prueba de la fermentación de la 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 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 final: 7,6	

Medio para la prueba de la fermentación de la 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 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 final: 7,6	

### Reactivos para la extracción de ADN

#### Solución de Lisis:

Se disolvieron 120 g de Tiocianato de Guanidina en 100 ml de 0,1M de TrisHCl pH 6,4.

Seguidamente se añadieron 22 ml de EDTA 0.2M pH 8,0 y 2,6 g de Tritón X n 100.

#### Solución de Lavado:

Se disolvieron 120 g de tiocianato de guanidina en 100 ml de TrisHCl pH 6,4.

Solución desnaturalizante (0.5M NaOH, 1.5M NaCl):

Se disolvieron 2 g de NaOH (30g/500ml H<sub>2</sub>O) y 8,8 g de cloruro sódico en 100 ml de agua destilada.

Sílica:

Se disolvieron 60 g de sílica en 500 ml de agua destilada. Se dejó decantar al menos 24 horas para posteriormente eliminar el sobrenadante. Se añadió el mismo volumen de agua destilada, se mezcló bien y se decantó durante otras 5 horas. Se eliminó parte del sobrenadante y se ajustó el pH a 2,0 con HCl concentrado. Por último, se distribuyó en alícuotas y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Solución TAE 50X:

Se disolvieron 24,2 g de Tris en 5,71 ml de ácido acético glacial y 10 ml de 0,5 M EDTA pH 8,0.

Solución TE pH: 8,0:

Se colocó en un matraz aforado 200 µl de EDTA 50X y 1 ml de TRIS-HCL 1M pH 8,0. Se ajustó el volumen a 100 ml con agua bidestilada y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

**Solución protectora para la liofilización.**

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

**Reactivos de la Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización (DGGE).**

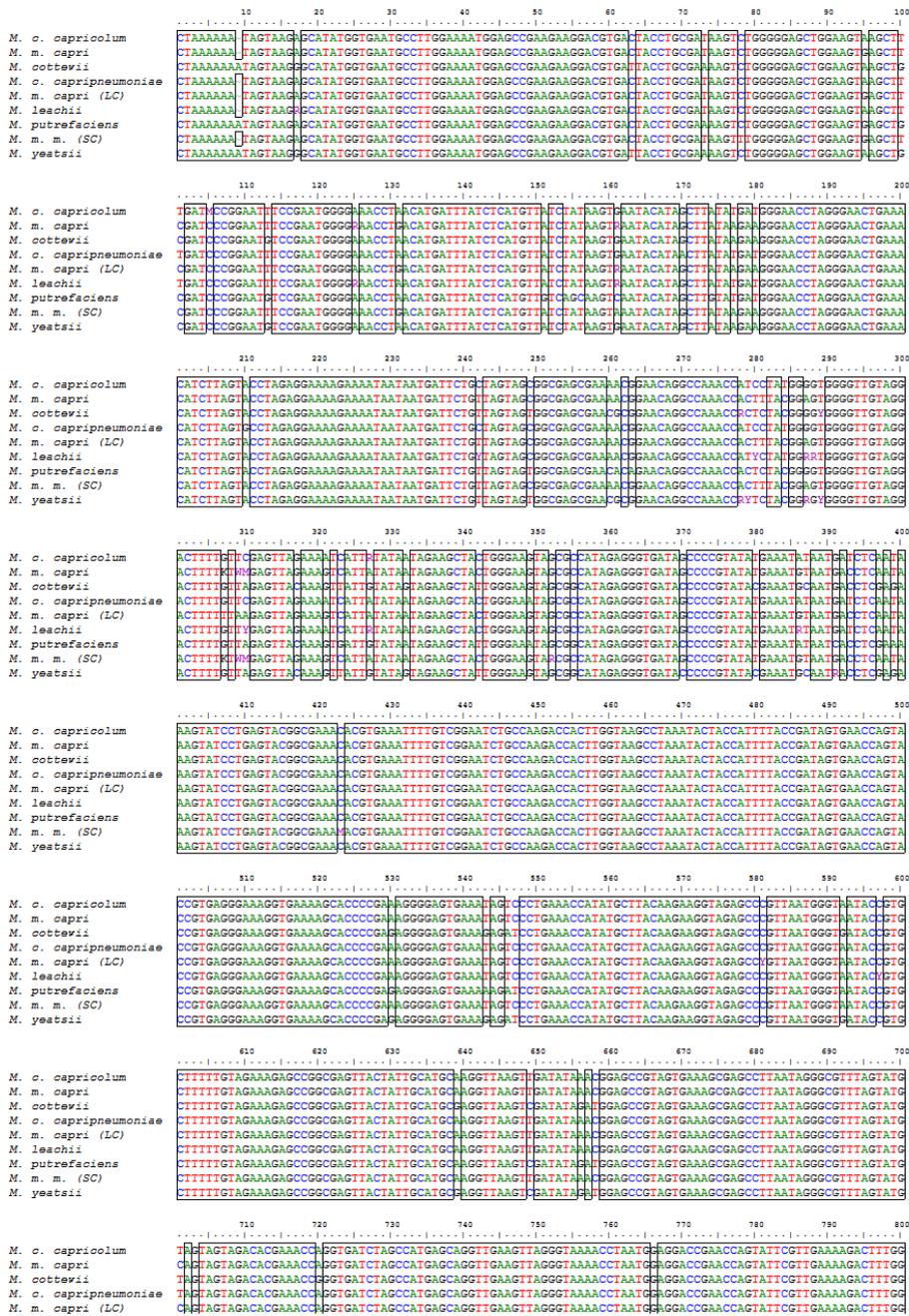
Solución de acrilamida al 60% de urea: “High” (H):

- Se mezclaron 126 g de urea con agua estéril hasta obtener una solución con un volumen de 200 ml.
- Se añadieron 125 ml de acrilamida al 30% a la solución anterior más 120 ml de formamida desionizada y 10 ml de buffer 50 x TAE.
- Se rellenó una cubeta con agua estéril hasta alcanzar un volumen de 500 ml.
- Se mezclaron suavemente ambas soluciones.

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

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

Anexo 2.2. Alineamiento completo del gen 23S



<i>M. leachii</i>	TTCTAGTAGACACGAAACC	CGTGTATCTAGCCATGAGCAGGTTGAAGTTAGGGTAAAACCTAATCC	AGGACCGAACCCAGTATTCGTTGAAAAGACTTTGG							
<i>M. putrefaciens</i>	CTTAGTAGACACGAAACC	CGTGTATCTAGCCATGAGCAGGTTGAAGTTAGGGTAAAACCTAATCC	AGGACCGAACCCAGTATTCGTTGAAAAGACTTTGG							
<i>M. m. (SC)</i>	TTCTAGTAGACACGAAACC	CGTGTATCTAGCCATGAGCAGGTTGAAGTTAGGGTAAAACCTAATCC	AGGACCGAACCCAGTATTCGTTGAAAAGACTTTGG							
<i>M. yeastsii</i>	CTTAGTAGACACGAAACC	CGTGTATCTAGCCATGAGCAGGTTGAAGTTAGGGTAAAACCTAATCC	AGGACCGAACCCAGTATTCGTTGAAAAGACTTTGG							
	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
<i>M. c. ospriculum</i>	ATGACTTTGGCTAG	CGTGAATTCCAATCGAACCT	CGAGATAGCTAGTTCTCCCGATATATCTTTAAGGATAGCGTT	CTGAAATGTT	CGGAGGT					
<i>M. m. ospri</i>	ATGACTTTGGCTAG	CGTGAATTCCAATCGAACCT	CGAGATAGCTAGTTCTCCCGATATATCTTTAAGGATAGCGTT	CTGAAATGTT	CGGAGGT					
<i>M. cotteswii</i>	ATGACTTTGGCTAG	CGTGAATTCCAATCGAACCT	CGAGATAGCTAGTTCTCCCGATATATCTTTAAGGATAGCGTT	CTGAAATGTT	CGGAGGT					
<i>M. c. ospripunemoniae</i>	ATGACTTTGGCTAG	CGTGAATTCCAATCGAACCT	CGAGATAGCTAGTTCTCCCGATATATCTTTAAGGATAGCGTT	CTGAAATGTT	CGGAGGT					
<i>M. m. ospri (LC)</i>	ATGACTTTGGCTAG	CGTGAATTCCAATCGAACCT	CGAGATAGCTAGTTCTCCCGATATATCTTTAAGGATAGCGTT	CTGAAATGTT	CGGAGGT					
<i>M. leachii</i>	ATGACTTTGGCTAG	CGTGAATTCCAATCGAACCT	CGAGATAGCTAGTTCTCCCGATATATCTTTAAGGATAGCGTT	CTGAAATGTT	CGGAGGT					
<i>M. putrefaciens</i>	ATGACTTTGGCTAG	CGTGAATTCCAATCGAACCT	CGAGATAGCTAGTTCTCCCGATATATCTTTAAGGATAGCGTT	CTGAAATGTT	CGGAGGT					
<i>M. m. (SC)</i>	ATGACTTTGGCTAG	CGTGAATTCCAATCGAACCT	CGAGATAGCTAGTTCTCCCGATATATCTTTAAGGATAGCGTT	CTGAAATGTT	CGGAGGT					
<i>M. yeastsii</i>	ATGACTTTGGCTAG	CGTGAATTCCAATCGAACCT	CGAGATAGCTAGTTCTCCCGATATATCTTTAAGGATAGCGTT	CTGAAATGTT	CGGAGGT					
	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
<i>M. c. ospriculum</i>	AGGACTGTAATCTATGATGCTG	CTAGCGGTACTGATTAGAATTAACCTCGAATGCCATAAT	TTT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT
<i>M. m. ospri</i>	AGGACTGTAATCTATGATGCTG	CTAGCGGTACTGATTAGAATTAACCTCGAATGCCATAAT	TTT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT
<i>M. cotteswii</i>	AGGACTGTAATCTATGATGCTG	CTAGCGGTACTGATTAGAATTAACCTCGAATGCCATAAT	TTT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT
<i>M. c. ospripunemoniae</i>	AGGACTGTAATCTATGATGCTG	CTAGCGGTACTGATTAGAATTAACCTCGAATGCCATAAT	TTT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT
<i>M. m. ospri (LC)</i>	AGGACTGTAATCTATGATGCTG	CTAGCGGTACTGATTAGAATTAACCTCGAATGCCATAAT	TTT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT
<i>M. leachii</i>	AGGACTGTAATCTATGATGCTG	CTAGCGGTACTGATTAGAATTAACCTCGAATGCCATAAT	TTT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT
<i>M. putrefaciens</i>	AGGACTGTAATCTATGATGCTG	CTAGCGGTACTGATTAGAATTAACCTCGAATGCCATAAT	TTT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT
<i>M. m. (SC)</i>	AGGACTGTAATCTATGATGCTG	CTAGCGGTACTGATTAGAATTAACCTCGAATGCCATAAT	TTT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT
<i>M. yeastsii</i>	AGGACTGTAATCTATGATGCTG	CTAGCGGTACTGATTAGAATTAACCTCGAATGCCATAAT	TTT	CT	CT	CT	CT	CT	CT	CT
	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
<i>M. c. ospriculum</i>	TTCTATGCTCGTAGGSGAAACAGCCAGATCGTCAGT	TAAGTCCCTAAAT	TTAAACTAAGTGTGAAGGATGTGGAA	TCACAA	TCACAGTACGATGTT					
<i>M. m. ospri</i>	TTCTATGCTCGTAGGSGAAACAGCCAGATCGTCAGT	TAAGTCCCTAAAT	TTAAACTAAGTGTGAAGGATGTGGAA	TCACAA	TCACAGTACGATGTT					
<i>M. cotteswii</i>	TTCTATGCTCGTAGGSGAAACAGCCAGATCGTCAGT	TAAGTCCCTAAAT	TTAAACTAAGTGTGAAGGATGTGGAA	TCACAA	TCACAGTACGATGTT					
<i>M. c. ospripunemoniae</i>	TTCTATGCTCGTAGGSGAAACAGCCAGATCGTCAGT	TAAGTCCCTAAAT	TTAAACTAAGTGTGAAGGATGTGGAA	TCACAA	TCACAGTACGATGTT					
<i>M. m. ospri (LC)</i>	TTCTATGCTCGTAGGSGAAACAGCCAGATCGTCAGT	TAAGTCCCTAAAT	TTAAACTAAGTGTGAAGGATGTGGAA	TCACAA	TCACAGTACGATGTT					
<i>M. leachii</i>	TTCTATGCTCGTAGGSGAAACAGCCAGATCGTCAGT	TAAGTCCCTAAAT	TTAAACTAAGTGTGAAGGATGTGGAA	TCACAA	TCACAGTACGATGTT					
<i>M. putrefaciens</i>	TTCTATGCTCGTAGGSGAAACAGCCAGATCGTCAGT	TAAGTCCCTAAAT	TTAAACTAAGTGTGAAGGATGTGGAA	TCACAA	TCACAGTACGATGTT					
<i>M. m. (SC)</i>	TTCTATGCTCGTAGGSGAAACAGCCAGATCGTCAGT	TAAGTCCCTAAAT	TTAAACTAAGTGTGAAGGATGTGGAA	TCACAA	TCACAGTACGATGTT					
<i>M. yeastsii</i>	TTCTATGCTCGTAGGSGAAACAGCCAGATCGTCAGT	TAAGTCCCTAAAT	TTAAACTAAGTGTGAAGGATGTGGAA	TCACAA	TCACAGTACGATGTT					
	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
<i>M. c. ospriculum</i>	GGCTTAGAGACA	CTCATTTAAAGAGTGGTAAACAGCTCACTAGTCGAGTGATTCTGCCCGAAAATC	ACCGGGGTTAAGTTTAC	CCCGAACT						
<i>M. m. ospri</i>	GGCTTAGAGACA	CTCATTTAAAGAGTGGTAAACAGCTCACTAGTCGAGTGATTCTGCCCGAAAATC	ACCGGGGTTAAGTTTAC	CCCGAACT						
<i>M. cotteswii</i>	GGCTTAGAGACA	CTCATTTAAAGAGTGGTAAACAGCTCACTAGTCGAGTGATTCTGCCCGAAAATC	ACCGGGGTTAAGTTTAC	CCCGAACT						
<i>M. c. ospripunemoniae</i>	GGCTTAGAGACA	CTCATTTAAAGAGTGGTAAACAGCTCACTAGTCGAGTGATTCTGCCCGAAAATC	ACCGGGGTTAAGTTTAC	CCCGAACT						
<i>M. m. ospri (LC)</i>	GGCTTAGAGACA	CTCATTTAAAGAGTGGTAAACAGCTCACTAGTCGAGTGATTCTGCCCGAAAATC	ACCGGGGTTAAGTTTAC	CCCGAACT						
<i>M. leachii</i>	GGCTTAGAGACA	CTCATTTAAAGAGTGGTAAACAGCTCACTAGTCGAGTGATTCTGCCCGAAAATC	ACCGGGGTTAAGTTTAC	CCCGAACT						
<i>M. putrefaciens</i>	GGCTTAGAGACA	CTCATTTAAAGAGTGGTAAACAGCTCACTAGTCGAGTGATTCTGCCCGAAAATC	ACCGGGGTTAAGTTTAC	CCCGAACT						
<i>M. m. (SC)</i>	GGCTTAGAGACA	CTCATTTAAAGAGTGGTAAACAGCTCACTAGTCGAGTGATTCTGCCCGAAAATC	ACCGGGGTTAAGTTTAC	CCCGAACT						
<i>M. yeastsii</i>	GGCTTAGAGACA	CTCATTTAAAGAGTGGTAAACAGCTCACTAGTCGAGTGATTCTGCCCGAAAATC	ACCGGGGTTAAGTTTAC	CCCGAACT						
	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
<i>M. c. ospriculum</i>	TACGGATTGTATG	AAATACAGTGGTAGGGGAG	TTCTAAATATGA	GAAGTCAGAC	TTGAA	TACTGGTGGAG	TTTTAGAAGTGATTATCCGGCCAA			
<i>M. m. ospri</i>	TACGGATTGTATG	AAATACAGTGGTAGGGGAG	TTCTAAATATGA	GAAGTCAGAC	TTGAA	TACTGGTGGAG	TTTTAGAAGTGATTATCCGGCCAA			
<i>M. cotteswii</i>	TACGGATTGTATG	AAATACAGTGGTAGGGGAG	TTCTAAATATGA	GAAGTCAGAC	TTGAA	TACTGGTGGAG	TTTTAGAAGTGATTATCCGGCCAA			
<i>M. c. ospripunemoniae</i>	TACGGATTGTATG	AAATACAGTGGTAGGGGAG	TTCTAAATATGA	GAAGTCAGAC	TTGAA	TACTGGTGGAG	TTTTAGAAGTGATTATCCGGCCAA			
<i>M. m. ospri (LC)</i>	TACGGATTGTATG	AAATACAGTGGTAGGGGAG	TTCTAAATATGA	GAAGTCAGAC	TTGAA	TACTGGTGGAG	TTTTAGAAGTGATTATCCGGCCAA			
<i>M. leachii</i>	TACGGATTGTATG	AAATACAGTGGTAGGGGAG	TTCTAAATATGA	GAAGTCAGAC	TTGAA	TACTGGTGGAG	TTTTAGAAGTGATTATCCGGCCAA			
<i>M. putrefaciens</i>	TACGGATTGTATG	AAATACAGTGGTAGGGGAG	TTCTAAATATGA	GAAGTCAGAC	TTGAA	TACTGGTGGAG	TTTTAGAAGTGATTATCCGGCCAA			
<i>M. m. (SC)</i>	TACGGATTGTATG	AAATACAGTGGTAGGGGAG	TTCTAAATATGA	GAAGTCAGAC	TTGAA	TACTGGTGGAG	TTTTAGAAGTGATTATCCGGCCAA			
<i>M. yeastsii</i>	TACGGATTGTATG	AAATACAGTGGTAGGGGAG	TTCTAAATATGA	GAAGTCAGAC	TTGAA	TACTGGTGGAG	TTTTAGAAGTGATTATCCGGCCAA			
	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
<i>M. c. ospriculum</i>	SAGTAACGTTTGGAAAGTGAGAAATCTTCCATGCCGTTTGACCAA	GGTTCCTGGCAAGGTTCTG	CCACCCAGGGTTAGT	CAGGACCTAAGG	CTAGGCT					
<i>M. m. ospri</i>	SAGTAACGTTTGGAAAGTGAGAAATCTTCCATGCCGTTTGACCAA	GGTTCCTGGCAAGGTTCTG	CCACCCAGGGTTAGT	CAGGACCTAAGG	CTAGGCT					
<i>M. cotteswii</i>	SAGTAACGTTTGGAAAGTGAGAAATCTTCCATGCCGTTTGACCAA	GGTTCCTGGCAAGGTTCTG	CCACCCAGGGTTAGT	CAGGACCTAAGG	CTAGGCT					
<i>M. c. ospripunemoniae</i>	SAGTAACGTTTGGAAAGTGAGAAATCTTCCATGCCGTTTGACCAA	GGTTCCTGGCAAGGTTCTG	CCACCCAGGGTTAGT	CAGGACCTAAGG	CTAGGCT					
<i>M. m. ospri (LC)</i>	SAGTAACGTTTGGAAAGTGAGAAATCTTCCATGCCGTTTGACCAA	GGTTCCTGGCAAGGTTCTG	CCACCCAGGGTTAGT	CAGGACCTAAGG	CTAGGCT					
<i>M. leachii</i>	SAGTAACGTTTGGAAAGTGAGAAATCTTCCATGCCGTTTGACCAA	GGTTCCTGGCAAGGTTCTG	CCACCCAGGGTTAGT	CAGGACCTAAGG	CTAGGCT					
<i>M. putrefaciens</i>	SAGTAACGTTTGGAAAGTGAGAAATCTTCCATGCCGTTTGACCAA	GGTTCCTGGCAAGGTTCTG	CCACCCAGGGTTAGT	CAGGACCTAAGG	CTAGGCT					
<i>M. m. (SC)</i>	SAGTAACGTTTGGAAAGTGAGAAATCTTCCATGCCGTTTGACCAA	GGTTCCTGGCAAGGTTCTG	CCACCCAGGGTTAGT	CAGGACCTAAGG	CTAGGCT					
<i>M. yeastsii</i>	SAGTAACGTTTGGAAAGTGAGAAATCTTCCATGCCGTTTGACCAA	GGTTCCTGGCAAGGTTCTG	CCACCCAGGGTTAGT	CAGGACCTAAGG	CTAGGCT					
	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500
<i>M. c. ospriculum</i>	TTTCTAGTGCATGGACACACAGGTTGATATTCTCTGTACCAG	TTTATTAGTGA	GGAGTGACCGAGAAGGATATAT	TATCCCGGGTCTGGATTTCTCC						
<i>M. m. ospri</i>	TTTCTAGTGCATGGACACACAGGTTGATATTCTCTGTACCAG	TTTATTAGTGA	GGAGTGACCGAGAAGGATATAT	TATCCCGGGTCTGGATTTCTCC						
<i>M. cotteswii</i>	TTTCTAGTGCATGGACACACAGGTTGATATTCTCTGTACCAG	TTTATTAGTGA	GGAGTGACCGAGAAGGATATAT	TATCCCGGGTCTGGATTTCTCC						
<i>M. c. ospripunemoniae</i>	TTTCTAGTGCATGGACACACAGGTTGATATTCTCTGTACCAG	TTTATTAGTGA	GGAGTGACCGAGAAGGATATAT	TATCCCGGGTCTGGATTTCTCC						
<i>M. m. ospri (LC)</i>	TTTCTAGTGCATGGACACACAGGTTGATATTCTCTGTACCAG	TTTATTAGTGA	GGAGTGACCGAGAAGGATATAT	TATCCCGGGTCTGGATTTCTCC						
<i>M. leachii</i>	TTTCTAGTGCATGGACACACAGGTTGATATTCTCTGTACCAG	TTTATTAGTGA	GGAGTGACCGAGAAGGATATAT	TATCCCGGGTCTGGATTTCTCC						
<i>M. putrefaciens</i>	TTTCTAGTGCATGGACACACAGGTTGATATTCTCTGTACCAG	TTTATTAGTGA	GGAGTGACCGAGAAGGATATAT	TATCCCGGGTCTGGATTTCTCC						
<i>M. m. (SC)</i>	TTTCTAGTGCATGGACACACAGGTTGATATTCTCTGTACCAG	TTTATTAGTGA	GGAGTGACCGAGAAGGATATAT	TATCCCGGGTCTGGATTTCTCC						
<i>M. yeastsii</i>	TTTCTAGTGCATGGACACACAGGTTGATATTCTCTGTACCAG	TTTATTAGTGA	GGAGTGACCGAGAAGGATATAT	TATCCCGGGTCTGGATTTCTCC						
	1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580	1590	1600



M. m. m. (SC)	CTCGTTAATTGGTTTCTAACITTCGCTTATCTCGTTAAGGACAGTGTTCGGTGGTGTGTTGACTGGGGCGGTCCGCTCCCAAAAGTAAACGG
M. yeatsii	CTCGTTAATTGGTTTCTAACITTCGCTTATCTCGTTAAGGACAGTGTTCGGTGGTGTGTTGACTGGGGCGGTCCGCTCCCAAAAGTAAACGG
	2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400
M. c. capricolum	GGCGCTCAAAGGTATCCTCAGTATGGTTGAAATCATCATAGAGCCCAAAGGTAGAAGGATGCTTAACCTCGGAGACTTACAAGTGGAAACAGATACGAAA
M. m. capri	GGCGCTCAAAGGTATCCTCAGTATGGTTGAAATCATCATAGAGCCCAAAGGTAGAAGGATGCTTAACCTCGGAGACTTACAAGTGGAAACAGATACGAAA
M. cottevilii	GGCGCTCAAAGGTATCCTCAGTATGGTTGAAATCATCATAGAGCCCAAAGGTAGAAGGATGCTTAACCTCGGAGACTTACAAGTGGAAACAGATACGAAA
M. c. ospreipneumoniae	GGCGCTCAAAGGTATCCTCAGTATGGTTGAAATCATCATAGAGCCCAAAGGTAGAAGGATGCTTAACCTCGGAGACTTACAAGTGGAAACAGATACGAAA
M. m. capri (LC)	GGCGCTCAAAGGTATCCTCAGTATGGTTGAAATCATCATAGAGCCCAAAGGTAGAAGGATGCTTAACCTCGGAGACTTACAAGTGGAAACAGATACGAAA
M. leachii	GGCGCTCAAAGGTATCCTCAGTATGGTTGAAATCATCATAGAGCCCAAAGGTAGAAGGATGCTTAACCTCGGAGACTTACAAGTGGAAACAGATACGAAA
M. putrefaciens	GGCGCTCAAAGGTATCCTCAGTATGGTTGAAATCATCATAGAGCCCAAAGGTAGAAGGATGCTTAACCTCGGAGACTTACAAGTGGAAACAGATACGAAA
M. m. m. (SC)	GGCGCTCAAAGGTATCCTCAGTATGGTTGAAATCATCATAGAGCCCAAAGGTAGAAGGATGCTTAACCTCGGAGACTTACAAGTGGAAACAGATACGAAA
M. yeatsii	GGCGCTCAAAGGTATCCTCAGTATGGTTGAAATCATCATAGAGCCCAAAGGTAGAAGGATGCTTAACCTCGGAGACTTACAAGTGGAAACAGATACGAAA
	2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500
M. c. capricolum	GTAGGACTTAGTGATCGGCGGTCCCCGTGGAAAGGCTCGCTCAACGGATAAAAATTACCCCGGGGATAACAGGCTTATCTCCCCAAGAGTTCACA
M. m. capri	GTAGGACTTAGTGATCGGCGGTCCCCGTGGAAAGGCTCGCTCAACGGATAAAAATTACCCCGGGGATAACAGGCTTATCTCCCCAAGAGTTCACA
M. cottevilii	GTAGGACTTAGTGATCGGCGGTCCCCGTGGAAAGGCTCGCTCAACGGATAAAAATTACCCCGGGGATAACAGGCTTATCTCCCCAAGAGTTCACA
M. c. ospreipneumoniae	GTAGGACTTAGTGATCGGCGGTCCCCGTGGAAAGGCTCGCTCAACGGATAAAAATTACCCCGGGGATAACAGGCTTATCTCCCCAAGAGTTCACA
M. m. capri (LC)	GTAGGACTTAGTGATCGGCGGTCCCCGTGGAAAGGCTCGCTCAACGGATAAAAATTACCCCGGGGATAACAGGCTTATCTCCCCAAGAGTTCACA
M. leachii	GTAGGACTTAGTGATCGGCGGTCCCCGTGGAAAGGCTCGCTCAACGGATAAAAATTACCCCGGGGATAACAGGCTTATCTCCCCAAGAGTTCACA
M. putrefaciens	GTAGGACTTAGTGATCGGCGGTCCCCGTGGAAAGGCTCGCTCAACGGATAAAAATTACCCCGGGGATAACAGGCTTATCTCCCCAAGAGTTCACA
M. m. m. (SC)	GTAGGACTTAGTGATCGGCGGTCCCCGTGGAAAGGCTCGCTCAACGGATAAAAATTACCCCGGGGATAACAGGCTTATCTCCCCAAGAGTTCACA
M. yeatsii	GTAGGACTTAGTGATCGGCGGTCCCCGTGGAAAGGCTCGCTCAACGGATAAAAATTACCCCGGGGATAACAGGCTTATCTCCCCAAGAGTTCACA
	2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600
M. c. capricolum	TCGACGGGGAGGTTTGGCACCTCGATGTCCGCTCATCGCATCCTGGAGCTGTAGTCGGTCCAAAGGGTTGGGCTGTTCCGCCATTAAAGCGGTACCGGAG
M. m. capri	TCGACGGGGAGGTTTGGCACCTCGATGTCCGCTCATCGCATCCTGGAGCTGTAGTCGGTCCAAAGGGTTGGGCTGTTCCGCCATTAAAGCGGTACCGGAG
M. cottevilii	TCGACGGGGAGGTTTGGCACCTCGATGTCCGCTCATCGCATCCTGGAGCTGTAGTCGGTCCAAAGGGTTGGGCTGTTCCGCCATTAAAGCGGTACCGGAG
M. c. ospreipneumoniae	TCGACGGGGAGGTTTGGCACCTCGATGTCCGCTCATCGCATCCTGGAGCTGTAGTCGGTCCAAAGGGTTGGGCTGTTCCGCCATTAAAGCGGTACCGGAG
M. m. capri (LC)	TCGACGGGGAGGTTTGGCACCTCGATGTCCGCTCATCGCATCCTGGAGCTGTAGTCGGTCCAAAGGGTTGGGCTGTTCCGCCATTAAAGCGGTACCGGAG
M. leachii	TCGACGGGGAGGTTTGGCACCTCGATGTCCGCTCATCGCATCCTGGAGCTGTAGTCGGTCCAAAGGGTTGGGCTGTTCCGCCATTAAAGCGGTACCGGAG
M. putrefaciens	TCGACGGGGAGGTTTGGCACCTCGATGTCCGCTCATCGCATCCTGGAGCTGTAGTCGGTCCAAAGGGTTGGGCTGTTCCGCCATTAAAGCGGTACCGGAG
M. m. m. (SC)	TCGACGGGGAGGTTTGGCACCTCGATGTCCGCTCATCGCATCCTGGAGCTGTAGTCGGTCCAAAGGGTTGGGCTGTTCCGCCATTAAAGCGGTACCGGAG
M. yeatsii	TCGACGGGGAGGTTTGGCACCTCGATGTCCGCTCATCGCATCCTGGAGCTGTAGTCGGTCCAAAGGGTTGGGCTGTTCCGCCATTAAAGCGGTACCGGAG
	2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700
M. c. capricolum	CTGGGTTTCAGAACCTCGTGAGACAGTTTGGTCCCTATCTGTTGTGGGCGTGGAAAAATTCGAAAGAGCTGTTCTAGTACGAGAGGACCGGAATGGATCTC
M. m. capri	CTGGGTTTCAGAACCTCGTGAGACAGTTTGGTCCCTATCTGTTGTGGGCGTGGAAAAATTCGAAAGAGCTGTTCTAGTACGAGAGGACCGGAATGGATCTC
M. cottevilii	CTGGGTTTCAGAACCTCGTGAGACAGTTTGGTCCCTATCTGTTGTGGGCGTGGAAAAATTCGAAAGAGCTGTTCTAGTACGAGAGGACCGGAATGGATCTC
M. c. ospreipneumoniae	CTGGGTTTCAGAACCTCGTGAGACAGTTTGGTCCCTATCTGTTGTGGGCGTGGAAAAATTCGAAAGAGCTGTTCTAGTACGAGAGGACCGGAATGGATCTC
M. m. capri (LC)	CTGGGTTTCAGAACCTCGTGAGACAGTTTGGTCCCTATCTGTTGTGGGCGTGGAAAAATTCGAAAGAGCTGTTCTAGTACGAGAGGACCGGAATGGATCTC
M. leachii	CTGGGTTTCAGAACCTCGTGAGACAGTTTGGTCCCTATCTGTTGTGGGCGTGGAAAAATTCGAAAGAGCTGTTCTAGTACGAGAGGACCGGAATGGATCTC
M. putrefaciens	CTGGGTTTCAGAACCTCGTGAGACAGTTTGGTCCCTATCTGTTGTGGGCGTGGAAAAATTCGAAAGAGCTGTTCTAGTACGAGAGGACCGGAATGGATCTC
M. m. m. (SC)	CTGGGTTTCAGAACCTCGTGAGACAGTTTGGTCCCTATCTGTTGTGGGCGTGGAAAAATTCGAAAGAGCTGTTCTAGTACGAGAGGACCGGAATGGATCTC
M. yeatsii	CTGGGTTTCAGAACCTCGTGAGACAGTTTGGTCCCTATCTGTTGTGGGCGTGGAAAAATTCGAAAGAGCTGTTCTAGTACGAGAGGACCGGAATGGATCTC
	2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800
M. c. capricolum	ACCCTGGTGTCTCTGTTGTACGCCAGTGGCAAGCAGGGTAGCTATGTGCBAAAGGATAATCGTGAAGGCATCTAAGCGAGAAGCCCTTTAAGA
M. m. capri	ACCCTGGTGTCTCTGTTGTACGCCAGTGGCAAGCAGGGTAGCTATGTGCBAAAGGATAATCGTGAAGGCATCTAAGCGAGAAGCCCTTTAAGA
M. cottevilii	ACCCTGGTGTCTCTGTTGTACGCCAGTGGCAAGCAGGGTAGCTATGTGCBAAAGGATAATCGTGAAGGCATCTAAGCGAGAAGCCCTTTAAGA
M. c. ospreipneumoniae	ACCCTGGTGTCTCTGTTGTACGCCAGTGGCAAGCAGGGTAGCTATGTGCBAAAGGATAATCGTGAAGGCATCTAAGCGAGAAGCCCTTTAAGA
M. m. capri (LC)	ACCCTGGTGTCTCTGTTGTACGCCAGTGGCAAGCAGGGTAGCTATGTGCBAAAGGATAATCGTGAAGGCATCTAAGCGAGAAGCCCTTTAAGA
M. leachii	ACCCTGGTGTCTCTGTTGTACGCCAGTGGCAAGCAGGGTAGCTATGTGCBAAAGGATAATCGTGAAGGCATCTAAGCGAGAAGCCCTTTAAGA
M. putrefaciens	ACCCTGGTGTCTCTGTTGTACGCCAGTGGCAAGCAGGGTAGCTATGTGCBAAAGGATAATCGTGAAGGCATCTAAGCGAGAAGCCCTTTAAGA
M. m. m. (SC)	ACCCTGGTGTCTCTGTTGTACGCCAGTGGCAAGCAGGGTAGCTATGTGCBAAAGGATAATCGTGAAGGCATCTAAGCGAGAAGCCCTTTAAGA
M. yeatsii	ACCCTGGTGTCTCTGTTGTACGCCAGTGGCAAGCAGGGTAGCTATGTGCBAAAGGATAATCGTGAAGGCATCTAAGCGAGAAGCCCTTTAAGA
	2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880 2890 2900
M. c. capricolum	TGAATTTTCCCAATCTTAGATTAAGATCCCATGTAGACCACATGGTGTATAGGATGGATGTGTAGCTGCTGAGGCCTTAAGCTAACCATTAACATA
M. m. capri	TGAATTTTCCCAATCTTAGATTAAGATCCCATGTAGACCACATGGTGTATAGGATGGATGTGTAGCTGCTGAGGCCTTAAGCTAACCATTAACATA
M. cottevilii	TGAATTTTCCCAATCTTAGATTAAGATCCCATGTAGACCACATGGTGTATAGGATGGATGTGTAGCTGCTGAGGCCTTAAGCTAACCATTAACATA
M. c. ospreipneumoniae	TGAATTTTCCCAATCTTAGATTAAGATCCCATGTAGACCACATGGTGTATAGGATGGATGTGTAGCTGCTGAGGCCTTAAGCTAACCATTAACATA
M. m. capri (LC)	TGAATTTTCCCAATCTTAGATTAAGATCCCATGTAGACCACATGGTGTATAGGATGGATGTGTAGCTGCTGAGGCCTTAAGCTAACCATTAACATA
M. leachii	TGAATTTTCCCAATCTTAGATTAAGATCCCATGTAGACCACATGGTGTATAGGATGGATGTGTAGCTGCTGAGGCCTTAAGCTAACCATTAACATA
M. putrefaciens	TGAATTTTCCCAATCTTAGATTAAGATCCCATGTAGACCACATGGTGTATAGGATGGATGTGTAGCTGCTGAGGCCTTAAGCTAACCATTAACATA
M. m. m. (SC)	TGAATTTTCCCAATCTTAGATTAAGATCCCATGTAGACCACATGGTGTATAGGATGGATGTGTAGCTGCTGAGGCCTTAAGCTAACCATTAACATA
M. yeatsii	TGAATTTTCCCAATCTTAGATTAAGATCCCATGTAGACCACATGGTGTATAGGATGGATGTGTAGCTGCTGAGGCCTTAAGCTAACCATTAACATA
	2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990 3000
M. c. capricolum	TAGATCGAG
M. m. capri	TAGATCGAG
M. cottevilii	TAGATCGAG
M. c. ospreipneumoniae	TAGATCGAG
M. m. capri (LC)	TAGATCGAG
M. leachii	TAGATCGAG
M. putrefaciens	TAGATCGAG
M. m. m. (SC)	TAGATCGAG
M. yeatsii	TAGATCGAG



## Capítulo 3

Resistencia a macrólidos en cepas relacionadas del grupo *M. mycoides*. Valor antimicrobiano de los extractos de *Artemisia vulgaris* L.

---







### 3.1. Introducción

Dentro del grupo *M. mycoides* podemos destacar dos especies por su patogenicidad y las pérdidas económicas que generan. En primer lugar, *M. mycoides* subsp *mycoides*, causante de la pleuroneumonía contagiosa bovina (CBPP), que es considerada por la Organización Mundial de la Salud como una de las enfermedades animales más graves que afectan al ganado en el África subsahariana, teniendo dicha enfermedad un gran impacto, debido a sus consecuencias en la reducción del suministro de alimentos y también a las restricciones comerciales y sus consiguientes pérdidas económicas. Actualmente en África se usa la cepa vacunal T1/44, desarrollada a partir de la cepa original de *M. mycoides* subsp *mycoides*, derivada de un aislamiento en Tanzania en los años cincuenta tras 44 pases en huevos embrionados (Sheriff y cols., 1952). Esta cepa vacunal proporciona protección parcial a los animales vacunados, pero la inmunidad que ofrece es solo a corto plazo e incluso puede provocar diferentes efectos adversos, entre los que se encuentran dicha enfermedad, lo que indica un potencial virulento latente, sobre todo cuando es aplicada directamente en los pulmones por medio de inoculación endobronquial (Mbulu y cols., 2004; Gourgues y cols., 2016). Este *mycoplasma*, también se encuentra involucrado, junto a *Mycoplasma agalactiae*, *Mycoplasma capricolum* subsp *capricolum* y *Mycoplasma putrefaciens* como causante de la agalaxia contagiosa, enfermedad englobada en la lista de declaración obligatoria por la OMS. Los animales, enfermos o asintomáticos, pueden actuar como portadores durante meses e incluso años postinfección, con un riesgo potencial de transmitir el agente a otros animales susceptibles (Corrales y cols., 2007).

En el grupo *M. mycoides* está también clasificada la especie *M. capricolum* subsp *capripneumoniae*, agente causal de la perineumonía contagiosa caprina (CCPP), enfermedad

devastadora en cabras y que también se encuentra incluida en la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la OMS. Este *mycoplasma* es considerado uno de los más complicados de cultivar in vitro, lo que dificulta su aislamiento. *M. capripneumoniae* subsp *capripneumoniae* comparte muchos rasgos genotípicos y fenotípicos con el resto de micoplasmas pertenecientes al grupo *M. mycoides*, lo que lleva a problemas de identificación, sobre todo cuando son usadas técnicas clásicas. Por ello, y por desacuerdos sobre la etiología de la enfermedad durante algún tiempo, se debe prestar atención a las historias clínicas para poder diferenciar entre la enfermedad real y otras pleuroneumonías causadas por otros miembros del grupo *M. mycoides*, que además a menudo vienen asociadas a otras patologías (Manso-Silván y cols., 2011).

El control de las micoplasmosis es llevado a cabo mediante la vacunación, muchas de ellas vacunas vivas atenuadas, que muestran una eficacia limitada y con antimicrobianos como alternativa o complemento a la vacunación (Mitchell y cols., 2013), si bien el tratamiento con antimicrobianos puede aliviar los síntomas clínicos, pero no impedir la propagación de la infección, pudiendo favorecer la aparición de portadores crónicos. Así mismo cada vez es mayor el número de casos en los que la terapia con antimicrobianos no es eficaz debido a la adquisición de resistencias, observándose un incremento de las mismas frente a macrólidos y fluoroquinolonas en numerosas especies de *Mycoplasma* (Murray y cols., 2017; Sato y cols., 2017).

### **3.1.1. Mecanismos de resistencia a antimicrobianos**

Los micoplasmas son bacterias que carecen de pared celular, por lo que los antimicrobianos cuya diana sea dicha estructura, como las penicilinas, beta-lactámicos y

glucopéptidos no tienen actividad frente a ellos. Otros antimicrobianos con distintos mecanismos de acción como las polimixinas, rifampicina y sulfonamidas también resultan ineficaces en su control (Bèbèar, 1996; Bèbèar y Pereyre, 2005). Aunque hay antibióticos eficaces frente a micoplasmas como macrólidos, quinolonas, tetraciclinas y aminoglucósidos (Lysnyanski y Ayling, 2016), si bien para el control de diversas micoplasmosis es necesario combinar vacunación y quimioterapia (Maes y cols., 2008; Lysnyanski y Ayling, 2016).

Los macrólidos son antibióticos que llevan un anillo macrocíclico de lactona al que están unidos 2 o más cadenas de azúcares. Se clasifican en macrólidos de 14 miembros, cuyo prototipo es la eritromicina, de 15 y de 16 miembros, entre estos últimos se encuentran la tilvalosina, tilosina, espiramicina y tilmicosina. Los macrólidos al igual que las lincosamidas, estreptograminas B y cetólidos actúan inhibiendo la síntesis proteica al unirse a la peptidil-transferasa de la subunidad 50S del ribosoma (Leclerq, 2002). La resistencia bacteriana a macrólidos y lincosamidas ocurre principalmente por inactivación enzimática, expulsión activa incrementada y alteración de la diana, sobre todo mutaciones en el gen del ARN ribosómico 23S, lo que impide la unión del antibiótico a su objetivo ribosómico. Además de la metilación ribosomal que afecta solo a la actividad de algunas moléculas lo mismo que sobre-expresión de bombas de expulsión activa. Otras resistencias son causadas por problemas del flujo de salida del antibiótico y por la inactivación del fármaco (Leclerq, 2002; Bèbèar y Pereyre, 2005).

### **3.1.2. Poder antimicrobiano del extracto de *Artemisia vulgaris* L.**

Es sabido que muchas plantas, especialmente las utilizadas en la homeopatía, producen compuestos farmacológicamente activos que tienen efecto antimicrobiano, antihelmíntico,

antifúngico, antiviral, anti-inflamatorio o actividad antioxidante (McGaw y cols., 2000). Las plantas medicinales son generalmente más fáciles de obtener que los productos farmacéuticos. Además, la aparición de resistencia a los antibióticos en bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas ha hecho aumentar el interés en plantas medicinales como fuente de compuestos antibacterianos únicos (Cowan, 1999; Murina y cols., 2009).

Debido a las condiciones de crecimiento de los micoplasmas no existen técnicas estandarizadas para la realización y lectura de CMI (Murina y cols., 2009). No obstante, estudios previos han determinado las CMI de diferentes extractos de plantas en bacterias y hongos (Eloff, 1998; Murina y cols., 2009), como es el caso de los extractos de *Artemisia herba-alba* y *Artemisia arborescens* para los que se ha demostrado efectividad frente a diferentes especies de *Mycoplasma*, como MmmLC, Mcc y Mptr (Al-Momani y cols., 2007).

*Artemisia* es un extenso género de plantas herbáceas o arbustivas de la familia de las compuestas o asteráceas (*Asteraceae*). Comprende 1449 especies descritas, de las que se han aceptado 474 hasta la fecha. Los principios activos de su extracto son (Judzentiene y Buzelyte, 2006; Haider y cols., 2003):

- Aceite esencial (0,02-0,3%): cineol, alcanfor, linalol o tuyona, estos son los componentes mayoritarios; además contiene borneol, alfa-cadinol, espatulenol, monoterpenos y lactonas sesquiterpénicas.
- Flavonoides: rutósido, isoramnetósido, quercetósido.
- Cumarinas: esculetina, esculina, escopoletina, umbeliferona.
- Poliacetilenos: triterpenos pentacíclicos.

-Fitosteroles: sitosterol, estigmasterol.

-Carotenoides

Dentro de los efectos que la artemisa produce podemos encontrar que tiene una acción antiespasmódica, antidiarreica, actúa como broncodilatador y anticolinérgico y tiene actividad traqueo-relajante, así como acción antimicrobiana, antihelmíntica, antifúngica, estrogénica y astringente. (Duke y cols., 2002; Govindaraj y cols., 2008; Khan y Gilani, 2009). Por su parte, *Artemisia thuscula* es una especie endémica de las Islas Canarias que se ha utilizado en la medicina folklórica canaria local como una panacea para una gran diversidad de problemas de salud. Tradicionalmente esta planta se ha utilizado como diurético, hipoglucémico, antidiarreico, uricosurico, espasmolítico, estomacal, carminativo, vermífugo, tranquilizante, pectoral y anticatarral, y se sigue utilizando hoy en día. Además, se utiliza como repelente de mosquitos y para otros insectos o plagas nocivos para las personas o cultivos de cosecha, mediante humo aromático (Atta-ur, 1988). El cultivo y la recolección de especies de *Artemisia* para fines medicinales y mágicos era una práctica común de los nativos de las islas canarias durante el periodo guanche (Colin, 2002). Por su parte, *Artemisia vulgaris* es una hierba común y una importante fuente de alérgenos en la isla subtropical de Tenerife, Islas Canarias, España (de la Torre Morín, 2001).

Uno de los objetivos de este estudio será el de valorar la efectividad de extractos de *Artemisia* en comparación con macrólidos y lincomicina frente a diferentes especies de *Mycoplasma* mediante la determinación de su CMI.

### 3.1.3. Definición y valoración de la CMI

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) es la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de una bacteria después de su incubación. La CMI es importante en diagnósticos de laboratorio para confirmar la resistencia bacteriana frente a agentes antimicrobianos y además para monitorizar la actividad de los nuevos posibles agentes con efecto antimicrobiano.

La interacción existente entre una cepa bacteriana y un antimicrobiano puede ser evaluada mediante el empleo de diferentes métodos, los cuales pueden ser cualitativos, siendo el caso de la difusión en agar, ya que los resultados se basan en la resistencia y/o susceptibilidad, o cuantitativos, un ejemplo lo tenemos en la dilución en agar o en medio líquido, que cuantifican dicha interacción expresándola como CMI. Todo ello nos permite la elección del mejor tratamiento posible en situaciones clínicas (Amsterdam, 2005).

Estando aprobados los criterios y directrices para las pruebas in vitro de sensibilidad para los agentes antimicrobianos frente a bacterias en veterinaria (Watts y cols., 1999), dichas pautas, en el caso de los micoplasmas, se reflejan en la revisión de Hannan (2000), donde se establecen recomendaciones para la valoración in vitro de la susceptibilidad a antimicrobianos en estas bacterias. Sin embargo, sigue sin existir una estandarización de los métodos empleados para la determinación de CMIs en medio líquido para muchas especies de *Mycoplasma*, como tampoco hay puntos de corte. No obstante, hay estandarizadas normas para la valoración de la actividad de antimicrobianos frente a algunas especies de *Mollicutes* que causan infecciones clínicas en seres humanos como *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum*

(Waites y cols., 2012). Sin embargo, las necesidades de crecimiento de estas especies difieren de las de otros micoplasmas como *M. bovis* (Lysnyanski y Ayling, 2016), más cercano filogenéticamente a los micoplasmas de este estudio. Asimismo, la caracterización de la resistencia a macrólidos en micoplasmas del grupo *M. mycoides* ha sido poco estudiada.

La técnica de dilución en medio líquido permite la determinación de la CMI y consiste en determinar la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano en las diversas concentraciones probadas de un cierto antimicrobiano, dicho crecimiento puede ser observado de forma directa o indirecta. Directamente por la turbidez del medio (Poumarat y Martel, 1989) o por el depósito de sedimento bacteriano (Loria y cols., 2003), o indirectamente por la incorporación de un sustrato, metabolizable por la bacteria, y que implique un cambio en el pH del medio, el cual debe ser observable a través de la incorporación de un indicador de pH al mismo (Hannan, 2000) o cuyo metabolismo entrañe cambios visibles en el medio (Devriese y Haesebrouck, 1991). Existen numerosos factores que puedan influir en el resultado y reproducibilidad de las pruebas de susceptibilidad, entre los que se encuentran: aquellos factores inherentes al microorganismo como sus propiedades estructurales y metabólicas; los factores propios del agente antimicrobiano, como la solubilidad y estabilidad, y los relacionados con la propia técnica, como la cantidad de inóculo utilizado o el pH del medio (Hannan, 2000; Amsterdam, 2005).

Los ribosomas están presentes en todas las células auto-replicantes, constituyendo su maquinaria de síntesis proteica. Se dividen en dos subunidades y se componen de proteínas ribosomales y ARN ribosomal (ARNr). Las bacterias tienen tres tipos de ARNr y su información genética se organiza en el genoma en el siguiente orden 16S-23S-5S, formando un operón. Los

ARNr 23S y 5S junto con proteínas conformarán la subunidad grande, mientras que el ARN 16S junto con otras proteínas conformarán la subunidad pequeña. Las secuencias de nucleótidos de las moléculas de ARNr contienen segmentos bien definidos de diferente variabilidad evolutiva que se conocen como regiones universales, semiconservativas y variables. El ARN ribosómico tiene la misma función indispensable en todas las células, dando igual la especie de que se trate, lo que significa que los genes correspondientes se encuentran bajo la misma presión evolutiva. Todas estas propiedades hacen del análisis de las secuencias del ARNr extremadamente útil para los estudios filogenéticos y de evolución (Weisburg y cols., 1989). Los micoplasmas del grupo *M. mycoides* tienen dos operones del ARN ribosómico (*rrnA* y *rrnB*), esto ha sido demostrado con análisis de enzimas de restricción e hibridación de ADN y en el análisis del gen 16S ARNr. Debido a pequeñas diferencias entre ambos operones, la aparición de polimorfismos es posible, e incluso pueden tener diferente longitud (en *Mmm* una de las copias de los genes 16S ARNr es 2 nucleótidos mayor que el otro) (Pettersson y cols., 1996).

Muchos antibióticos sistémicos suprimen el crecimiento bacteriano inhibiendo la función de sus ribosomas, los cuales son importantes como objetivos terapéuticos por su papel esencial en la proliferación celular (traducen la información genética en proteínas), su abundancia y por la presencia de diferencias estructurales importantes entre los ribosomas de células procariontas y eucariotas. Antibióticos MLS (macrólidos, lincosamidas, streptograminas), tetraciclinas, aminoglucósidos, cloramfenicol, ácido fusídico y mupirocina inhiben satisfactoriamente la síntesis de proteínas. Sin embargo, a pesar de la diversidad estructural entre estos antibióticos, el número de lugares de acción en los ribosomas es modesto, preferentemente se encuentran en los centros asociados con la peptidiltransferasa y la GTPasa de la subunidad 50S y en la región

decodificadora en la subunidad 30S. Por lo tanto, una mutación en estas zonas conferiría resistencias cruzadas entre estos antibióticos (Canu y cols., 2002).

En bacterias se han descrito varios mecanismos de resistencias adquiridas a macrólidos: inactivación del antibiótico, eflujo activo del mismo y modificación de la diana por mutación del ARNr 23S y/o proteínas ribosomales (Vester y Douthwate, 2001). Por ahora se han descrito resistencias a macrólidos adquiridas por parte de micoplasmas por el mecanismo de la mutación del ARNr (Pereyre y cols., 2007). Las posiciones A2058 y A2059 (numeración de *E. coli*) parecen ser esenciales para la unión con macrólidos (Pereyre, 2002). Todos los macrólidos y sus derivados se unen al mismo lugar de la subunidad ribosomal 50S con su aminoazúcar C5 en una orientación similar; sin embargo, los macrólidos con 14 átomos en el macrociclo y los que tienen 16 átomos adoptan diferentes conformaciones, permitiendo de ese modo a los macrólidos de 16 átomos evitar la unión con la guanina en la posición 2058 (Wu y cols, 2005). Los micoplasmas presentan diferentes fenotipos de resistencias intrínsecas a antibióticos macrólidos. Por ejemplo, *M. pneumoniae* es susceptible naturalmente a macrólidos, lincosamida, estreptogramina y ketólidos (derivados de la eritromicina), mientras que *M. hominis* es intrínsecamente resistente a ciertos macrólidos (con 14 y 15 átomos en el macrociclo) y ketólidos, pero susceptible a josamicina (macrólido con 16 átomos) y lincosamidas. También se han observado resistencias intrínsecas a macrólidos con 14 átomos en el macrociclo en otras especies de micoplasmas como *M. fermentans* y *M. pulmonis* (Pereyre, 2002). La diana molecular de los macrólidos se encuentra en los dominios II y V del gen 23S ARNr y en las proteínas ribosómicas L4 y L22 (Canu y cols., 2002). En *M. hominis* esta resistencia ha sido asociada con una transición guanina a adenina en la posición 2057, en el dominio V del gen 23S ARNr (Pereyre y cols., 2002). En *M. gallisepticum* esta

misma mutación está asociada con resistencias a eritromicina (Wu y cols, 2005). Resistencias adquiridas frente a macrólidos para cepas de *M. hominis* y *M. pneumoniae* se han descrito raramente. Sin embargo, mutantes *in vitro* de *M. hominis* resistentes a macrólidos de 16 átomos presentaban una mutación en la posición 2062 (Funeri y cols., 2001), mientras que mutantes de *M. pneumoniae* presentaban transiciones de adenina a guanina en las posiciones 2058 y 2059 (Morozumi y cols., 2005). El dominio II del gen del ARNr 23S es menos conservador que la región de la peptidiltransferasa en el dominio V. Por todo esto, intentar correlacionar resistencias intrínsecas a macrólidos en estas especies con la naturaleza del nucleótido en la posición 752 es difícil (Pereyre y cols., 2002). Por otro lado, se sabe que *M pneumoniae* posee una sola copia del ADNr 23S y que, por lo contrario, *M hominis* presenta dos copias, por lo que se esperan mutantes tanto homocigóticos como heterocigóticos (Pereyre y cols., 2002). Mutantes resistentes a macrólidos de *M. hyopneumoniae* obtenidos *in vivo* adquirieron una mutación puntual A 2058 G (Stakenborg y cols., 2005).

#### **3.1.4. Finalidad y objetivos**

La finalidad de este estudio fue la de caracterizar la resistencia a macrólidos en micoplasmas del grupo *M. mycoides*, y determinar la efectividad antimicrobiana de los extractos de *Artemisia vulgaris L.* en cepas de especies relacionadas con este grupo.

##### Objetivos del estudio:

1. Selección *in vitro* de cepas resistentes a eritromicina a partir de cepas sensibles de *M. mycoides* subsp. *mycoides* y *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*.

2. Caracterización de mecanismos responsables de resistencia en los mutantes seleccionados *in vitro*

3. Determinar la efectividad *in vitro* de extractos de *Artemisia vulgaris* L. como antimicrobiano frente a cepas de especies del grupo *M. mycoides* y otras filogenéticamente cercanas.

4. Valoración de la sensibilidad a macrólidos en cepas de colección de especies pertenecientes al grupo *M. mycoides* y otras especies filogenéticamente cercanas a dicho grupo.

### 3.2. Material y métodos

#### 3.2.1. Caracterización de la resistencia a eritromicina

Esta parte del estudio se llevó a cabo en el CIRAD (Francia), con la colaboración de la doctora Lucía Manso Silván, en el entorno de una estancia de investigación predoctoral. Los micoplasmas seleccionados para realizar este estudio fueron *Mycoplasma mycoides* subsp *mycoides* (Mmm) y *Mycoplasma capricolum capripneumoniae* (Mccp). A su vez se usaron dos cepas de cada especie; la cepa virulenta 8740-Rita y la cepa vacunal T1/44/2K en el caso de Mmm y como representantes de Mccp se trabajó con 9231- Abomsa y 95043-C1, todas facilitadas por el banco del centro CIRAD y con el permiso del Dr. Francois Thiaucourt. Estas cepas de micoplasmas se tienen que trabajar en laboratorios de bioseguridad de nivel 3, a excepción del Mmm T1/44 se puede trabajar con un nivel de seguridad 2. El macrólido seleccionado fue la eritromicina, la cual fue cedida también por el CIRAD (Erythromycin SIGMA). Los valores de referencia de CMI iniciales para este antibiótico se tomaron de la bibliografía, dando unos valores de 0,12 µg/ml tanto para Mmm como para Mccp (Ayling y cols., 2005). Las cepas se reconstituyeron de perlas de microbank (Pro-Lab Diagnostic) que estaban conservados a -80°C. Para ello se añadió una perla

en 3 ml de medio modificado de Hayflick (Woubit y cols., 2004). En el caso de trabajar con Mccp el medio se suplementaba con un 10% adicional de suero de caballo. Los cultivos se incubaron en estufa a 37°C y con atmósfera rica en CO<sub>2</sub> (5%) entre 24-48h para Mmm y de 72h para Mccp. Los medios líquidos de cultivo eran observados diariamente, y una vez se apreció turbidez en el medio, lo que indicaba un posible crecimiento de las bacterias, se sembró en placas del mismo medio de cultivo en sólido (Woubit y cols., 2004) para su verificación, incubándose en estufa con las mismas condiciones que antes. Una vez verificado que los micoplasmas crecían correctamente y que formaban colonias típicas, se procedió a clonar los cultivos para proveer el inóculo de los experimentos.

La dilución del antibiótico empleado en el estudio variaba en función de las concentraciones que queríamos tener en las placas. Se partió de una solución alcohólica madre (stock) de 10 mg/ml de etanol. Esta solución se diluyó en agua ultrapura (Sigma) hasta conseguir una concentración de 1 mg/ml (conteniendo un 10% de etanol), que se esterilizó mediante su filtración con filtros con un diámetro de poro de 0,22 µm. Esta solución es la que se utilizó para conseguir placas de 90 mm de diámetro con 20 ml de medio modificado de Hayflick (con un 10% más de suero para Mccp) sólido con las siguientes concentraciones de eritromicina: 0, 0,015, 0,03, 0,06, 0,12, 0,24, 0,48, 0,96 y 1,92 µg/ml.

Las placas con las diferentes concentraciones de eritromicina fueron sembradas con el inóculo de los experimentos, incubándose en las mismas condiciones que antes. Las placas se observaban diariamente hasta una semana después.

Se preparaban placas con y sin antibiótico, estas últimas utilizadas para calcular las unidades formadoras de colonias (ufc) (Bradbury, 1977), para poder obtener nuevas colonias con las que continuar trabajando y como controles negativos. Además de placas que incluían el diluyente (10% de etanol) con el que se preparó el antibiótico, para verificar que éste no interfería en el crecimiento de los micoplasmas del estudio. Las ufc eran necesarias para poder calcular las frecuencias de mutaciones. Para lo cual se precisaba al menos 15 colonias por placa para llevar a cabo dicha titulación (Lee y cols., 1987). Para ello, se contaron el número de colonias y este valor fue multiplicado por el factor de dilución utilizado en el recuento y por los mililitros utilizados de la dilución seleccionada, como se muestra en el ejemplo:

Numero de colonias → 54

Dilución del contaje → 6

$$54 * 1/10^{-6} * 1/0.02 \rightarrow 2,7 * 10^9$$

Mililitros alicuotados en la dilución-6 → 0,02 ml

El procedimiento consistía en hacer diluciones seriadas desde el cultivo, se tomaron 50 µl desde éste y se pasaron a 450 µl de medio líquido, obteniendo la dilución 1, desde ésta tomamos otros 50 µl y los pasamos a 450 µl de medio, así sucesivamente hasta alcanzar la dilución deseada para cada especie. Desde cada dilución se tomaron alícuotas de 20 µl y se sembraron en placas marcadas con las diferentes diluciones. Pasadas unas 48-72 horas, dependiendo de la especie con la que se trabajó, se hizo el recuento de las colonias al microscopio.

Para corroborar el valor de la CMI a trabajar se prepararon placas con valores inferiores y superiores de eritromicina al descrito por Ayling y cols. (2005). Las placas se inocularon con 100 µl del inóculo de cada cepa de estudio, extendiéndose uniformemente y se esperó a que el

inóculo fuera absorbido por las placas, para posteriormente incubarse en estufa. En función de la especie de trabajo, el tiempo que permanecieron estas placas en estufa para su visualización varió, así para Mmm fue de 5 días para calcular la titulación y para la búsqueda de colonias resistentes de 5-7 días. Mientras que para Mccp fue de hasta 7 días para la titulación y entre 7 y 10 días para el conteo de colonias resistentes a eritromicina.

La concentración de antibiótico para la obtención de mutantes se fue tomada en base a los valores de CMI obtenidos para cada cepa estudiada. Para la cepa T1/44 se realizaron tres estudios diferentes, mientras que para el resto de las cepas se llevó a cabo un experimento por cepa. Protocolariamente se prepararon placas con una concentración de eritromicina de 2 y 4 veces el valor de la CMI de cada cepa. Desde aquí, aquellas colonias resistentes que crecieran en esas condiciones se pasaron a medio líquido con una concentración de 4 veces el valor de la CMI calculada. Estos cultivos líquidos se controlaron durante una semana en busca de la aparición de turbidez en el medio, lo que es indicativo de crecimiento microbiano. Una vez comprobado el crecimiento también en medio sólido, se conservaron alícuotas del cultivo con un suplemento del 50% de suero de caballo y a -20°C.

Una vez confirmada la selección de una posible cepa mutante resistente a la eritromicina, se llevó a cabo la extracción del ADN desde las alícuotas conservadas a -20°C. de estas colonias resistentes, así como de las cepas madre de las mismas, utilizando el kit "blood and tissue kit de Qiagen". Posteriormente se realizó la amplificación del gen del ARN ribosómico 23S utilizando los oligonucleótidos diseñados en este estudio para los miembros del grupo *M. mycoides*. Para la PCR del gen que codifica para la región 23S del ARN ribosomal, se usaron 6 parejas de cebadores,

de esta manera la secuencia consenso se obtenía a partir del alineamiento de los 6 fragmentos (A, B, C, D, E, F), siendo amplificado cada uno de ellos por una pareja diferente de cebadores. Los oligos están descritos en el capítulo 2 (**Tabla 2.4**), así como los protocolos utilizados (**Tabla 2.5**).

Los productos de PCR obtenidos fueron purificados y se mandaron a secuenciar al Servicio de Genética Forense de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. La secuenciación se hizo en el secuenciador *3130 xl Genetic Analyzer* y el procesado de las muestras fue llevado a cabo con el software *Run 3130xl Data Collection V3.0*. Las cepas madres-sensibles a la eritromicina (Mmm T1/44 y Mccp Abomsa y 95043) fueron secuenciadas en su totalidad, así como uno de sus mutantes. En base a los resultados obtenidos, del resto de cepas Mmm (Rita y T1/44) se decidió secuenciar solo el fragmento E.

### **3.2.2. Colorimetría**

Previo a la realización de pruebas de inhibición de crecimiento, se llevó a cabo una prueba de colorimetría, donde se estableció la concentración adecuada de trabajo para cada especie de *Mycoplasma*, en base a lo descrito por Poveda y Nicholas (1998). En función de la especie de *Mycoplasma*, y ajustándonos a la bioquímica de cada una, se realizó esta prueba con los diferentes medios con los sustratos metabólicos adecuados.

Fue necesario realizar un subcultivo 48 horas antes de comenzar con la colorimetría en la placa de microdilución. En cada pocillo de la placa de microdilución se añadieron 100 µl del medio con el sustrato elegido (manosa, glucosa...), para, a continuación, cargar 100 µl del cultivo del micoplasma correspondiente (desde tubo subcultivado 48 horas antes) al primer pocillo, donde la concentración del micoplasma quedará marcada como 0. Desde este primer

pocillo tomamos 10 µl de líquido y los traspasamos al pocillo contiguo (pocillo 2), quedándose en este una concentración de 1:10 (-1). Esta operación se repitió sucesivamente hasta el pocillo número 11 (-10), mientras que en el pocillo número 12 teníamos el control negativo. Las pruebas se realizaron por duplicado para corroborar resultados. La observación de la placa se realizó a las 24, 48 y 72 horas, en función del crecimiento de los micoplasmas del estudio y teniendo en cuenta el pocillo control positivo de crecimiento del micoplasmas (pocillo 1). La dilución a utilizar venía determinada por la mayor dilución que producía un cambio de color tras la incubación de según el crecimiento de la especie de *Mycoplasma* correspondiente. Así para aquellas especies con un rápido crecimiento, se tomaron los valores comprendidos entre los resultados a las 24 y 48 horas de observación. (Poveda y Nicholas, 1998).

### **3.2.3. Determinación de la actividad *in vitro* del extracto de *Artemisia vulgaris* L.**

La valoración de la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto de acetona de artemisa se realizó determinando las CMI del extracto frente a diferentes cepas de *Mycoplasma*. El extracto de *Artemisia vulgaris* L. fue cedido por la Dra. Milagros Rico Santos (Departamento de Químicas, ULPGC). Se diluyó en DMSO para poder disolver el extracto y posteriormente se le añadió agua hasta alcanzar una concentración del dimetilsulfóxido (DMSO) del 25% y obtener una concentración de 200 mg/ml del extracto. Los micoplasmas utilizados se muestran en la **tabla 3.1**, tomándose las cepas de referencia de cada especie/subespecie. Se incluyeron además de los micoplasmas del grupo *M. mycoides*, otras especies cercanas a estas filogenéticamente, ya usadas en otros capítulos de esta tesis.

Especie	Cepa	Acrónimo
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i>	PG1	Mmm
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i>	PG3	Mmc
<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>	California Kid (CK)	Mcc
<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capripneumoniae</i>	F38	Mccp
<i>M. cottewii</i>	VIS	Mcot
<i>M. yeatsii</i>	GIH	Myeat
<i>M. putrefaciens</i>	KS1	Mptr

**Tabla 3.1.** Especies y cepas de referencia usadas en la determinación de la actividad *in vitro* del extracto de artemisa.

#### 3.2.4. Preparación del inóculo

El inóculo debió ser subcultivado con al menos 48 horas de antelación a la realización del experimento. A partir de este subcultivo se llevaron a cabo diluciones seriadas hasta alcanzar la concentración deseada para cada especie/subespecie, que se calculó previamente en la colorimetría. La dilución del inóculo dependió de la especie/subespecie de *Mycoplasma* con el que se estaba trabajando.

El medio de cultivo para todos ellos fue PH líquido (Kirchhoff y Rosengarten, 1984), a excepción de Mccp donde se usó SP4-II (Ramírez y cols., 1997), se realizó un cultivo 48 horas antes de la realización del estudio a partir de una única colonia sembrada en medio sólido, la temperatura de incubación en estufa fue de 37°C. Una vez tenemos el cultivo con 48 horas se diluyó a una concentración de  $1 \cdot 10^{-2}$  (1:100). Este valor se obtuvo a partir de la prueba de colorimetría.

El cálculo de CMI fue realizado en placas de microtitulación utilizando como marcador de crecimiento el método bioquímico adecuado como recomendaban Hannan (2000) y Devriese y Haesebrouck (1991). Para ello se añadieron 100 µl del medio elegido para el ensayo con cada

especie de *Mycoplasma* a cada uno de los pocillos de la placa. A continuación, se alicuotaron 100 µl de extracto de artemisa desde la solución madre o de stock, a la primera columna de pocillos, con lo que en esta primera columna de pocillos quedaba con una concentración a la mitad de la inicial (100mg/ml). Desde estos pocillos se pipetearon 100 µl que se pasaron a la siguiente columna de pocillos, con lo que volvimos a diluir la concentración del extracto una vez (50mg/ml) y así, se fueron pasando alícuotas de 100 µl sucesivamente desde la columna de pocillos anterior, diluyendo la concentración del extracto a la mitad con respecto a la que le precedía, hasta la octava columna, donde nos quedamos a una concentración de 0,78 mg/ml. Las últimas cuatro columnas de la placa se dedicaron para los controles positivos y negativos; por un lado, los controles negativos del medio y del extracto, con lo que se verificaba que no existía contaminación y, además que el extracto no interfiriera en el pH del medio, causando cambios en la coloración. Para los positivos se añadieron solo inóculo y medio y en otra columna con DMSO al 25% (diluyente de extracto), confirmando que el crecimiento de los micoplasmas no se veía interferido a causa del diluyente.

Finalmente, se inocularon 100 µl de cada inóculo a cada uno de los pocillos correspondientes, exceptuando los destinados a los controles negativos, con lo que, en aquellos pocillos con el extracto, la concentración del mismo se vuelve a ver reducida a la mitad, obteniéndose concentraciones con valores que fueron desde 50mg/ml hasta 0,39mg/ml. Finalmente, se cubrieron todos los pocillos con 50 µl de parafina y se incubaron en atmósfera húmeda y en estufa a 37º C. La visualización se efectuó desde las 24 hasta las 72 horas en función de la especie/subespecie de *Mycoplasma*. Debido a que el extracto interfería con la lectura del cambio de color del medio, se sembraron 5µl a las 24 y a las 48 horas, desde los pocillos con las

diferentes concentraciones del extracto, en placas de medio PH o SP4-II sólido, donde se comprobó, mediante el uso del microscopio óptico, el crecimiento de las colonias de micoplasmas o su ausencia.

### 3.2.5. Preparación de placas de microdilución para determinación de CMI

Las CMI del extracto de *Artemisia vulgaris* L. fueron comparadas con las de macrólidos en varias especies de micoplasmas. Los antibióticos macrólidos ensayados fueron Espiramicina (SIGMA), Tilmicosina (VETRANAL) y Lincomicina (VETRANAL).

El protocolo empleado para la realización de las placas de inhibición de crecimiento con dichos antibióticos fue el descrito por Poveda y Nicholas (1998), Hannan (2000), Amsterdam (2005) y Antunes (2007). En cuanto a las especies trabajadas en este apartado se ven reflejadas en la **Tabla 3.2.**

Especie	Cepa	Acrónimo
<i>M. mycoides</i> subsp <i>capri</i>	Y-Goat	MmmLC
<i>M. mycoides</i> subsp <i>mycoides</i>	PG1	Mmm
<i>M. mycoides</i> subsp <i>capri</i>	PG3	Mmc
<i>M. capricolum</i> subsp <i>capricolum</i>	California Kid (CK)	Mcc
<i>M. capricolum</i> subsp <i>capripneumoniae</i>	F38	Mccp
<i>M. leachii</i>	PG50	Mleach
<i>M. cottewii</i>	VIS	Mcot
<i>M. yeatsii</i>	GIH	Myeat
<i>M. putrefaciens</i>	KS1	Mptr

**Tabla 3.2.** Especies de micoplasmas y sus cepas correspondientes, para la determinación de MICs de macrólidos.

### **3.2.6. Preparación de las soluciones stock de los antibióticos ensayados**

Los antibióticos utilizados se disolvieron en etanol (Amsterdam, 2005) para preparar una solución madre a concentraciones entre 1 y 2 mg/ml. A partir de estas diluciones madre se elaboraron las diferentes alícuotas diluyendo con agua. Todas las soluciones madre de antibióticos preparadas se filtraron para asegurar su esterilidad antes de almacenarlas a -20 °C.

Para la preparación de las placas de microdilución para la valoración de CMIs, los rangos iniciales de concentraciones de antibióticos a valorar se determinaron siguiendo referencias previas de Ayling y cols. (2005), Antunes y cols. (2006) y Uemura y cols. (2010), ajustándose posteriormente en caso necesario según el nivel de susceptibilidad o resistencia de las cepas ensayadas.

### **3.2.7. Determinación de los valores de CMIs para antibióticos y extractos de *Artemisia vulgaris* L.**

Se siguió el mismo procedimiento para valorar las CMIs de los macrólidos y extractos de *Artemisia vulgaris*. Todas las placas de microdilución se realizaron al menos por duplicado, además, para asegurar la repetitividad del estudio y confirmar la posible degradación del antibiótico almacenado, el experimento fue repetido a los 60 y 180 días después de preparar el antibiótico. Las placas fueron observadas a las 24, 48, 72 y 84 horas posteriores al experimento, dependiendo del tipo de crecimiento de la especie de *Mycoplasma*. Para la preparación de las placas para valorar las CMIs del extracto de *Artemisia vulgaris* se utilizó un rango de concentraciones de 100 mg/ml a 0,78 mg/ml, de manera que en el rango de concentraciones

utilizadas quedaban incluidos los valores de CMI encontrados para extractos de otras especies de *Artemisia* en micoplasmas descritos por otros autores (Al-Momani y cols., 2007).

En el caso de Mcc la determinación de la sensibilidad o resistencia se realizó mediante un método modificado de difusión en disco (Poveda y Nicholas, 1998). Para ello se impregnaron discos estériles con las diferentes concentraciones de antibióticos, además de con agua y con el diluyente utilizado como controles negativos. Los discos se colocaron sobre la superficie del agar en placas de medio PH sólido (Kirchhoff y Rosengarten, 1984), donde previamente se había sembrado el inóculo. Durante las 24 y 48 horas posteriores se observaba si existían halos de inhibición alrededor de los discos, siendo medidos en caso afirmativo. Las placas se realizaron por triplicado para cada antibiótico. Al mismo tiempo se realizó dicha prueba con la cepa MmmLC (Y-Goat), para contrastar los resultados con aquellos obtenidos desde el estudio con antibióticos en líquido.

### **3.3. Resultados**

#### **3.3.1. Caracterización del gen 23S ARNr de cepas resistentes a eritromicina**

##### **3.3.1.1 Valores de CMI de eritromicina**

El estudio pudo ser llevado a cabo con las cuatro cepas seleccionadas, ya que todas crecieron suficientemente. Los valores de CMI frente a la eritromicina de cada una de las cepas tras el estudio llevado a cabo en el CIRAD, se muestran en la **tabla 3.3**. Siendo para las cepas de Mmm de 0,12 µg/ml y mayor en el caso de las cepas de Mccp, donde se obtuvo un valor de 0,24 µg/ml.

Cepa	Valor CMI eritromicina µg/ml
T1/44 (Mmm)	0,12
8740 Rita (Mmm)	0,12
Abomsa (Mccp)	0,24
C1- 95043 (Mccp)	0,24

**Tabla 3.3** Valores de CMI de eritromicina en las cepas madre de las mutantes seleccionadas *in vitro* con eritromicina.

Los resultados de las pruebas realizadas con el diluyente utilizado para la preparación de los antibióticos (etanol) en cuanto a su interacción con los micoplasmas fueron satisfactorios, ya que este diluyente no interfirió en el crecimiento de las cepas de *Mycoplasma* trabajadas.

### 3.3.1.2. Frecuencias de selección de colonias resistentes a eritromicina.

Se consideraron mutantes resistentes a todas aquellas colonias seleccionadas *in vitro* con concentraciones de eritromicina 2 y 4 veces superiores a la CMI del macrólido en las cepas origen, y que posteriormente crecieron en concentraciones 4X CMI de eritromicina. Para cada una de las cepas se llevaron a cabo estudios por separado, así para la cepa T1/44/K2 fueron llevados a cabo cuatro experimentos para la selección de mutantes con eritromicina, obteniéndose inicialmente desde las placas nueve posibles resistentes al antibiótico desde tres de los cuatro experimentos. De los cuales, se pudieron verificar como resistentes cuatro. En el primero se logra verificar dos mutantes con una frecuencia de mutación de  $2,19 \cdot 10^{-10}$  con una concentración de eritromicina dos veces el valor de la CMI. En el segundo caso, al igual que en el anterior a dos veces la CMI, la frecuencia fue de  $4,09 \cdot 10^{-10}$  con 1 mutante y en el tercer experimento se obtuvo un único mutante a cuatro veces la CMI con una frecuencia de mutación de  $8,47 \cdot 10^{-10}$ .

Para la cepa 8740-Rita se hizo un solo experimento de selección de colonias resistentes con eritromicina. De las siete ufc halladas *a priori*, se pudieron confirmar cuatro mutantes, con una frecuencia de mutación de  $6,43 \cdot 10^{-9}$  a dos veces el valor establecido de la CMI.

En el caso de las cepas de Mccp (Abomsa y C1-95043), solo se realizó un experimento con cada una de ellas. Así se obtuvo una ufc resistente a la eritromicina por cada cepa, siendo las frecuencias de mutación  $3,3 \cdot 10^{-9}$  para Abomsa y  $2,76 \cdot 10^{-8}$  para C1-95043, en el caso de Abomsa hallamos la colonia resistente a 4X CMI y para Rita a dos veces del valor de la CMI establecidos para estas cepas. El resumen de los resultados de la selección *in vitro* con eritromicina se muestran en las **tablas 3.4 y 3.5**.

Cepa	Frecuencias de selección de mutantes con eritromicina
T1/44 (Mmm)	Estudio 1 → $2,19 \cdot 10^{-10}$ Estudio 2 → $4,09 \cdot 10^{-10}$ Estudio 3 → $4 \cdot 10^{-10}$
8740 Rita (Mmm)	$6,43 \cdot 10^{-9}$
Abomsa (Mccp)	$3,3 \cdot 10^{-9}$
C1- 95043 (Mccp)	$2,76 \cdot 10^{-8}$

**Tabla 3.4.** Frecuencias de selección de mutantes para los diferentes experimentos en cada cepa con eritromicina.

Cepa	Eritromicina 2X MIC	Eritromicina 4X MIC	Mutantes confirmados eritromicina
T1/44 (Mmm)	5 mutantes	4 mutantes	4
8740 Rita (Mmm)	7 mutantes		4
Abomsa (Mccp)		1 mutante	1
C1- 95043 (Mccp)	1 mutante		1

**Tabla 3.5.** Mutantes hallados y confirmados.

La nomenclatura empleada para las cepas resistentes a las eritromicina de cada cepa madre de Mmm y Mccp se muestra en la **tabla 3.6**.

Cepa	Cepas con mayor resistencia halladas	Cepas confirmadas como mutantes y que fueron secuenciadas
T1/44 (Mmm)	Estudio 1→T1, T2, T3, T4 y T5 Estudio 2→ T6 y T7 Estudio 3→T8 y T9	T1, T3, T6 y T8
8740 Rita (Mmm)	R1, R2, R3, R4, R5, R6 y R7	R1, R2, R3 y R4
Abomsa (Mccp)	ab	ab
C1- 95043 (Mccp)	E1	E1

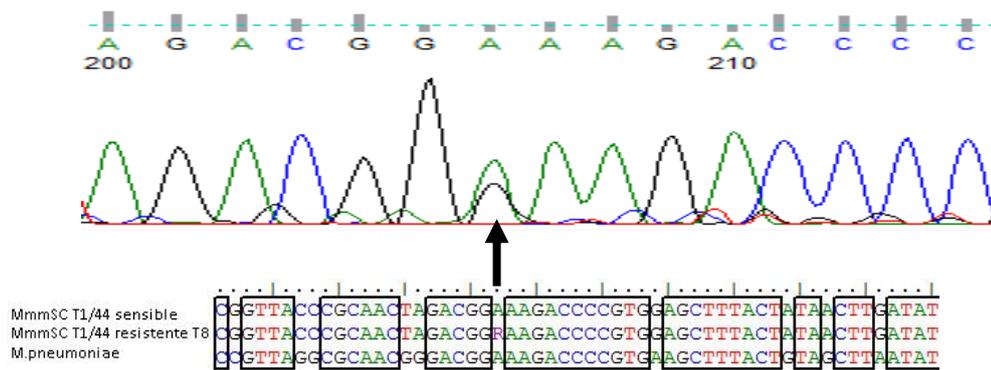
**Tabla 3.6.** Cepas aisladas con mayor resistencia (mutantes) a partir de cada cepa origen.

### 3.3.1.3. Secuenciación cepas resistentes a eritromicina

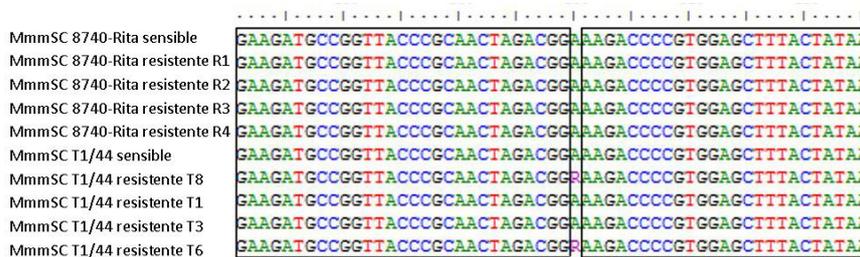
Tras la extracción de ADN y la posterior realización de PCR, se llevó a cabo la comprobación de estas mediante geles de agarosa, en los cuales se obtuvieron resultados positivos con todas las cepas trabajadas, tanto las cepas madres como sus resistentes a la eritromicina.

El ADN fue extraído de las cuatro cepas madre trabajadas, así como de todos aquellos mutantes obtenidos de cada una de ellas. En cuanto a la realización de PCRs y la secuenciación de los mismos se llevó a cabo una selección para dichas pruebas. Esta se basó en la relación existente entre los mutantes obtenidos, con respecto a los experimentos llevados a cabo para cada cepa. Se enviaron a secuenciar los seis segmentos que codifican para el ARN ribosomal 23S en la cepa madre de Mmm cepa T1/44 madre y su mutante T8. Fue observada una transición de A a G en la posición 2080, que coincide con la posición 2058 en *E. coli* y 2063 en *M. pneumoniae* (**figura 3.1**). En base a estos resultados únicamente se secuenció el fragmento E para el resto de los tres mutantes de esta cepa y la cepa madre Mmm Rita y sus cuatro mutantes, ya que se trataba del segmento correspondiente donde se había hallado la posible causa asociada al incremento de resistencia a la eritromicina.

El mismo polimorfismo (R) visto para T8, fue hallado para los mutantes T3 y T6. No habiendo ninguna diferencia significativa entre el mutante T1 y su correspondiente cepa madre, ni tampoco hallándose ninguna relevancia para la otra cepa de Mmm Rita, ni ninguno de sus cuatro mutantes (**figura 3.2**).



**Figura 3.1.** Cromatograma donde apreciamos polimorfismo y secuencia comparativa de Mmm T1/44, cepa madre y uno de sus mutantes (T8) y *M. pneumoniae*.

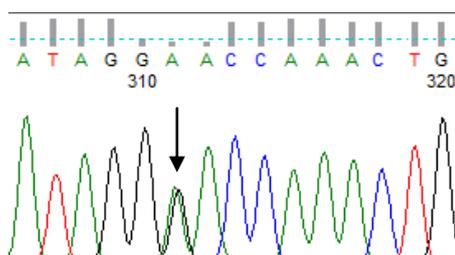


**Figura 3.2.** Cromatograma comparativo cepas resistentes de Mmm 8740 Rita y T1/44. Para las cepas madre de Mccp Abomsa y C1-95043 y sus resistentes a eritromicina se secuenciaron completamente la región que codifica para el ARNr 23S, es decir los 6 fragmentos.

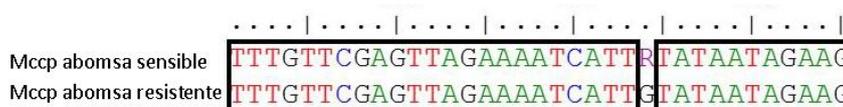
En cuanto a los resultados de la primera secuenciación de la cepa madre de Mccp Abomsa (a1) se observó un polimorfismo simple de un nucleótido (A/G) en el par de bases 327 (**tabla 3.7**) de la región que codifica al gen ARNr 23S, el cual no está presente en la cepa resistente (ab) (**figuras 3.3 y 3.4**).

Micoplasma	Cepa	CMI µg/ml	Numeración mycoplasma*	Numeración E. coli	Nucleotido
T1/44 (Mmm)	T1/44	0,12	2080	2058	A
	T1	0,48	2080	2058	A
	T3	0,48	2080	2058	R (A/G)
	T6	0,48	2080	2058	R (A/G)
	T8	0,48	2080	2058	R (A/G)
Rita (Mmm)	Rita	0,12	2080	2058	A
	R1	0,48	2080	2058	A
	R2	0,48	2080	2058	A
	R3	0,48	2080	2058	A
	R4	0,48	2080	2058	A
Abomsa (Mccp)	a1	0,24	327	294-295**	R(A/G)
			2633	2721	M(A/C)
	ab	0,96	327	294-295**	G
			2633	2721	C
C1- 95043 (Mccp)	95043	0,24	1927	1904	C
			2032	2009	R (A/G)
	E1	0,96	1927	1904	Y (T/C)
			2032	2009	G

**Tabla 3.7.** Diferencias halladas entre las cepas madre y sus resistentes a la eritromicina. T1, T3, T6, T8, ab y E1, cepas resistentes a la eritromicina de las diferentes especies trabajadas. T1/44, a1 y 95043 cepas sensibles a la eritromicina. \*Numeración de la alineación de las secuencias de los genes 23S de las cepas tipo de los micoplasmas Mmm y Mccp que están en el anexo del capítulo II. \*\* En E. coli hay una delección de esta parte de la secuencia.

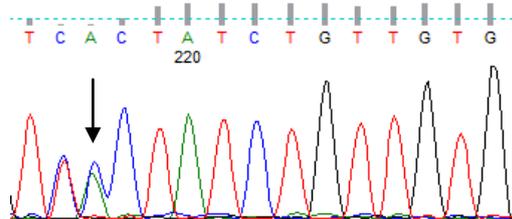


**Figura 3.3.** Cromatograma donde se visualiza un polimorfismo R (A/G) para Mccp Abomsa.

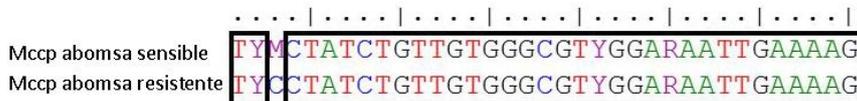


**Figura 3.4.** Secuencia comparativa entre Mccp cepa Abomsa sensible a la eritromicina (a1) y cepa resistente a la eritromicina (ab).

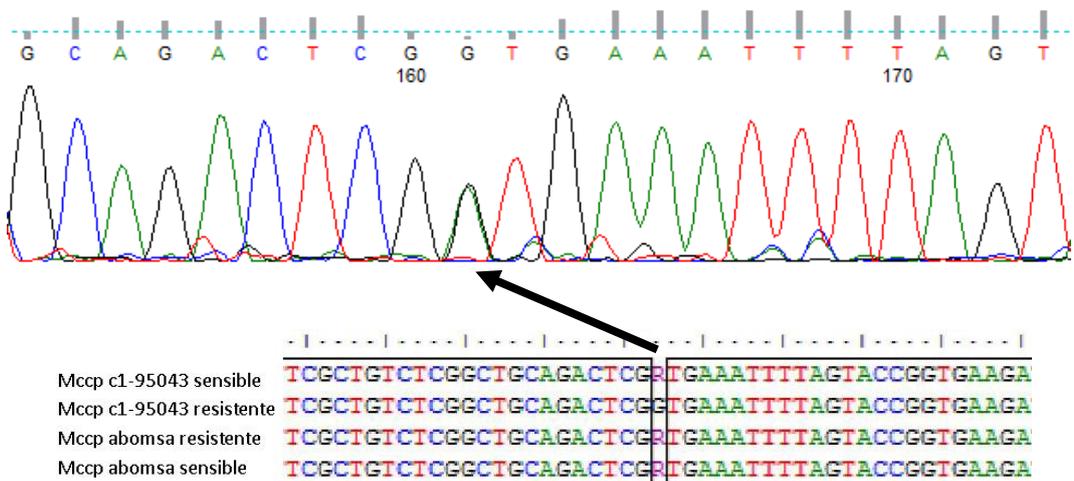
Además, en el par de base 2633 (2721 numeración *E. coli*) la cepa madre presenta una transición de pares de bases de A a C (M), no presente en la cepa resistente, donde el nucleótido presente es C (figuras 3.5 y 3.6).



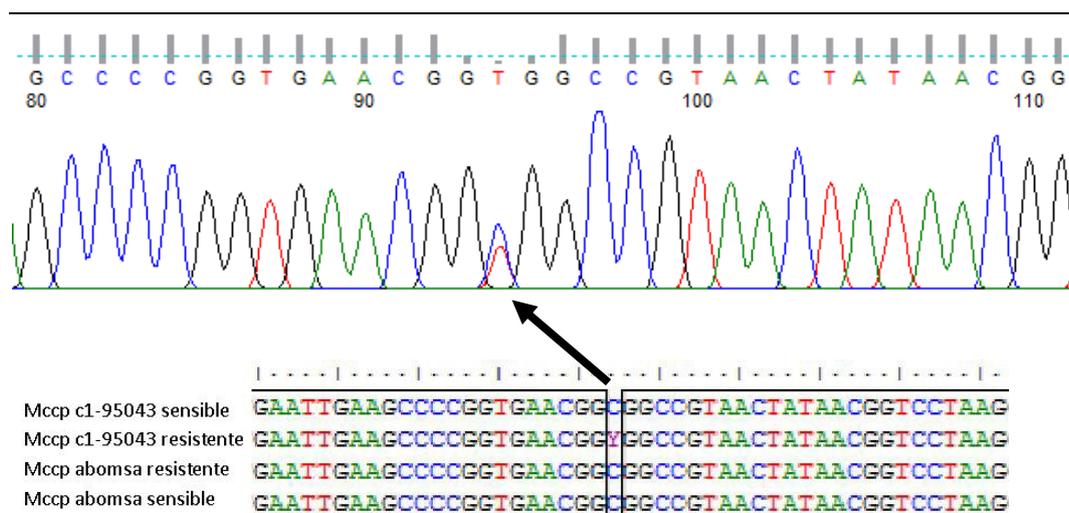
**Figura 3.5.** Cromatograma donde se visualiza dos polimorfismos Y (T/C) y M (A/C) para Mccp Abomsa.



**Figura 3.6.** Secuencia comparativa entre Mccp cepa Abomsa sensible a la eritromicina (a1) y cepa resistente a la eritromicina (ab).



**Figura 3.7.** Cepa madre Mccp 95043, polimorfismo A/G (R), con su cromatograma.



**Figura 3.8.** Cepa resistente Mccp 95043 E1, polimorfismo T/C (Y), con su cromatograma.

En cuanto a la cepa Mccp C1-95043 hallamos un polimorfismo para la cepa madre ausente en la resistente (E1) y que además coincide con las cepas sensible y resistente de Mccp Abomsa, en el par de base 2032 (2009 numeración *E. coli*), cuya transición es de A a G (R) (**figura 3.7**). Y otro a nivel de la cepa resistente, que no se halla en la cepa sensible a eritromicina en el par de base 1927 (1904 numeración *E. coli*), correspondiente a una Y (T/C) (**figura 3.8**). En la **tabla 3.7** se puede apreciar un resumen de las posiciones con numeración *E. coli* en las que se hallaron dichos polimorfismos.

### 3.3.2. Actividad in vitro del extracto de *Artemisia vulgaris* L.

Se comprobó que el diluyente para las pruebas de inhibición del crecimiento de los micoplasmas con extracto de artemisa, DMSO al 25%, no afectó al crecimiento de las cepas de micoplasmas estudiadas. En todas las placas de los controles positivos, a excepción de Mccp, por motivos de requerimientos de crecimiento de dicho micoplasma, se obtuvo crecimiento de colonias. En el caso de los controles negativos no hubo presencia de colonias bacterianas. Ya que

el extracto cambiaba de coloración el medio en las placas de microdilución se debía sembrar desde los pocillos de las diferentes concentraciones hasta placas de medio PH o SP4-II en función de la cepa trabajada.

Cepas	50 mg/ml	25 mg/ml	12,5 mg/ml	6,25 mg/ml	3,125 mg/ml	1,56 mg/ml
Mmc	-	-	4*	++	++	+++
MmmLC	+	++	++	++	++	++
Mmm	-	-	+	++	++	++
Mcc	-	-	-	++	++	++
Mleach	-	+	+	++	++	++
Mcot	-	1*	-	++	++	++
Myeat	-	-	1*	+	++	++
Mptr	-	-	+	++	++	++

**Tabla 3.8.** Crecimiento en placa de las diferentes cepas de micoplasmas en las concentraciones ensayadas del extracto de *Artemisia*. \* N° de colonias visibles.

Los resultados obtenidos indicaron valores de CMI de 12,5 mg/ml en las cepas Mmc, Mcc, Mcot y Myeat, mientras que frente a las cepas de Mmm y Mptr, el valor fue 25 mg/ml, para Mleach el resultado fue de 50 mg/ml y en el caso de MmmLC el crecimiento no se vio inhibido a las concentraciones trabajadas (**tabla 3.8**).

Por su parte, Mcot creció en 25 mg/ml, aunque se trató de una única colonia, esta colonia se pasó a medio líquido PH sin extracto, pero no obtuvimos crecimiento. En el caso de las cepas de Myeat y en Mmc, se observaron una y cuatro colonias, respectivamente en la misma concentración de 12,5 mg/ml. Por lo que, 25 mg/ml fue la concentración del extracto de *Artemisa* que inhibió el 83,3 % de los micoplasmas estudiados y 50 mg/ml el 100%.

### **3.3.3. Valores CMI de espiramicina y lincomicina en las cepas de referencia del estudio**

Las concentraciones finales de cada antibiótico por pocillo variaron en función de la cepa trabajada en cada caso y del antibiótico empleado. Así, los rangos utilizados finalmente se encontraron entre 15 y 0,015 µg/ml. Los valores de las CMIs de espiramicina, lincomicina y tilmicosina se muestran en la **tabla 3.9**. Así, para la espiramicina la concentración inhibitoria menor fue para la cepa PG-1 (Mmm), con un valor de 0,03 µg/ml y de 0,06 µg/ml para el resto de micoplasmas analizados en medio líquido, exceptuando a Mleach, para el que se necesitó una concentración de 0,24 µg/ml. El estudio en medio sólido de Mcc mostró unos valores más elevados para todos los antibióticos, en el caso de la espiramicina se necesitó una concentración de 2.5 µg/ml para que se viese inhibido el crecimiento alrededor del disco. Este es un valor 41 veces superior al precisado por el resto de micoplasmas en medio líquido.

Para la lincomicina la menor concentración necesaria para la inhibición del crecimiento fue en las cepas Y-Goat (MmmLC) y PG3 (Mmc), con un valor aproximado de 0,25 µg/ml, siendo para el resto de las cepas 0,5 µg/ml. Al igual que para el antibiótico anterior, el valor en Mcc es superior, entre 10 y 12 µg/ml. La cepa KS-1(Mputr) fue la que tuvo un valor CMI menor para la tilmicosina (0,03 µg/ml) y las cepas PG3 (Mmc), Y-Goat (MmmLC) y PG1 (Mmm) con una concentración de 0,12 µg/ml las que precisaron de una concentración mayor para ver su crecimiento inhibido. Para el caso de Mcc el valor fue de 0,4 µg/ml. Por lo tanto, de los antibióticos ensayados tilmicosina fue el más efectivo inhibiendo el crecimiento de los micoplasmas excepto en las cepas PG50 y KS1, mientras que lincomicina fue el menos efectivo.

Cepas	Espiramicina (µg/ml)	Lincomicina (µg/ml)	Tilmicosina (µg/ml)	Extracto artemisa (mg/ml)
<i>Mycoplasma mycoides capri</i>	0,06	0,25	0,12	12,5
<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> LC	0,06	0,25	0,12	12,5
<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i>	0,03	0,5	0,12	25
<i>Mycoplasma capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i> *	2.5	10-12	0.4	12.5
<i>Mycoplasma leachii</i>	0,24	0,5	0,06	50
<i>Mycoplasma cottewii</i>	0,06	0,5	0,12	12,5
<i>Mycoplasma yeatsii</i>	0,06	0,5	0,06	12,5
<i>Mycoplasma putrefaciens</i>	0,06	0,5	0,03	25

**Tabla 3.9.** Comparativa valores CMI en antibióticos frente a extracto *Artemisia*. \*Valores obtenidos del estudio realizado en placa con discos impregnados.

En la **tabla 3.10** se pueden observar los valores de las CMIs necesarias para inhibir el crecimiento en MmmLC en placas de microdilución y estos valores en el estudio paralelo llevado a cabo en placas en medio sólido con discos impregnados con las diferentes concentraciones de los antibióticos, siendo más elevados en el caso del medio sólido.

	Espiramicina (µg/ml)	Lincomisina (µg/ml)	Tilmicosina (µg/ml)
MmmLC (medio sólido)	0,06	0,25	0,12
MmmLC (medio líquido)	2.5	1.5	0,12

**Tabla 3.10.** Comparativa de los valores de las CMIs obtenidos en MmmLC en medio líquido frente a medio sólido.

Tras la reproducibilidad del estudio se observa una disminución en la efectividad del antibiótico en los mutantes seleccionados *in vitro*, indicada por un aumento en el valor de la concentración necesaria de antibiótico para inhibir el crecimiento bacteriano. Así en el caso de la

espiramicina la concentración mínima inhibitoria en Mmc pasa de 0,06 µg/ml a 0,25 µg/ml, en el caso de Mmm y Mleach este valor pasa de ser 0,03 µg/ml a 0,25 µg/ml. Y para Mcot el valor CMI en el día 0 del estudio se correspondió con 0,06 µg/ml y en el día 180 con 0,5 µg/ml. Con la lincomicina también observamos un aumento en las concentraciones requeridas, siendo este aumento en Mputr del 0,5 µg/ml a un rango entre 1 y 2 µg/ml.

#### **3.4. Discusión**

La selección de los micoplasmas del estudio llevado a cabo en el CIRAD (Francia), se realizó en base a la importancia de los mismos en la ganadería, ya que ambos son causantes de enfermedades de declaración obligatoria y provocan graves pérdidas, particularmente en África y Asia, pudiéndose alcanzar una mortalidad del 80% en el caso de la CCPP, provocada por Mccp. Además de ser una amenaza para aquellos países libres de las enfermedades causadas por estos (Fischer y cols., 2012).

La efectividad del sistema de conservación de microorganismos de difícil cultivo, como las del presente estudio, mediante microbank quedó demostrada, ya que se obtuvo crecimiento desde todas las cepas reconstituidas desde las perlas de microbank (Seidel y Gareis, 1995). Aunque para la cepa Mmm Rita se debió reconstituir por segunda vez, ya que en la primera ocasión no creció lo suficiente y se perdió el cultivo. Por ello, cabe destacar la dificultad que entrañó trabajar con estas bacterias sobre todo con Mccp, ya que, aunque el medio modificado de Hayflick (Woubit y cols., 2004) para el cultivo de esta especie fue enriquecido con un 10% de suero de caballo adicional, su crecimiento fue muy lento y escaso, lo que se tuvo en cuenta en el cálculo de las frecuencias de selección. No obstante, el medio y las condiciones de cultivo empleadas en el crecimiento de los micoplasmas del estudio desde su almacenaje a -80°C en

perlas de microbank, fue satisfactorio, incluso en aquellas cepas en las que dicho crecimiento se ve dificultado por sus requerimientos nutricionales. Observándose en todos los casos formas de colonias típicas en su crecimiento en placas de cultivo sólido y una doble hélice en el fondo de los tubos de medio líquido, indicativo de crecimiento de estas cepas.

En la última década se ha observado un incremento considerable en las resistencias a los macrólidos en cepas de micoplasmas aisladas de animales, lo que nos confirma la necesidad de la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas, además del control frente al uso indiscriminado de antibióticos en la práctica veterinaria (Pond y cols., 2014). Dichas resistencias vienen definidas por tres mecanismos generales; inactivación enzimática, aumento del flujo de salida y alteración de los sitios de unión. La metilación ribosómica es el mecanismo más extendido de resistencia a los macrólidos y lincosamidas, pero este mecanismo afecta sólo a un subconjunto de estas moléculas. De forma similar, los mecanismos de eflujo no confieren resistencia a todos los macrólidos. Por su parte, la modificación de la diana ribosómica tiene como resultado una resistencia de amplio espectro a macrólidos (Leclercq 2002). De esta forma, las mutaciones más comunes que causan resistencia a macrólidos se encuentran en el dominio V en el gen del ARNr 23S en las posiciones 2058 y 2059 según la numeración del gen en *Escherichia coli* (Jensen y cols., 2008). Las mutaciones de A a C, G o U en este sitio han sido implicadas en la resistencia a macrólidos en *E. coli* (Vester y cols., 1987), interfiriendo en la unión de la eritromicina al ribosoma (Douthwaite y cols., 1993).

Los valores de las CMIs frente a eritromicina de las cepas trabajadas en Francia se correspondieron con lo descrito por Ayling y cols. (2005) para las cepas de Mmm, no siendo así

para las cepas de Mccp, para las cuales este valor fue el doble, 0,24 µg/ml, como se puede observar en la **tabla 3.8**. Siendo las concentraciones de eritromicina en las placas del estudio de 0,06, 0,12, 0,24, 0,48 y 0,96 µg/ml para Mccp y con un rango de 0,015 hasta 0,48 µg/ml para Mmm. En ambos casos el mayor valor fue el equivalente a cuatro veces el de las CMIs para cada cepa. Dicho valor es el mismo al que se comprobaban las colonias tomadas desde las placas como posibles resistentes a eritromicina.

El periodo de observación de las placas se estableció desde los cinco hasta los diez días, ya que la aparición de colonias posteriores a este período era considerado efecto de la degradación del antibiótico en el medio, además del envejecimiento del propio medio en sí. La preparación de las placas y la siembra del inóculo debía de realizarse con 24 horas de diferencia, ya que hacerlo con menos tiempo no nos confirmaba que las placas estuviesen lo suficientemente secas como para añadir el inóculo y con más tiempo podía haber degradación del antibiótico en el medio. Una vez sembradas las placas con los inóculos se mantenían en estufa para su visualización, la cual varió en función de la cepa de trabajo. Para Mmm T1/44 fue de 5 días para calcular la titulación y de entre 5 y 7 días para la búsqueda de colonias resistentes. En el caso de la cepa Rita de Mmm y las dos cepas de Mccp fue de hasta 7 días para la titulación de la placa y de 7 a 10 días para el conteo de colonias resistentes a la eritromicina.

La frecuencia de selección de micoplasmas mutantes resistentes a la eritromicina de este estudio mostrados en la **tabla 3.4**, da unos valores ligeramente inferiores a los previamente descritos por Lee y cols. (1987). Estas diferencias son fácilmente explicables ya que se ha descrito

que dicha tasa puede variar en función de las condiciones de cultivo (Savva, 1980). No obstante, con estas tasas fuimos capaces de obtener varios mutantes.

Aquellas colonias resistentes halladas *a priori* en las placas a dos y cuatro veces el valor CMI fueron cultivadas en medio líquido a cuatro veces el valor de las CMIs para su confirmación como resistentes, asegurándonos de que aquellas cepas que diesen un positivo en placa desde estos medios fuesen realmente resistentes al antibiótico. Evitando mantener colonias que creciesen en las placas por degradación del antibiótico o mal reparto del mismo en el medio en la elaboración de las placas.

En lo que al género *Mycoplasma* y su resistencia a macrólido se refiere, la especie más estudiada es *M. pneumoniae*. En esta y otras especies que portan un solo operon ribosómico la resistencia a macrólidos está estrechamente relacionada con mutaciones en el gen del ARN ribosómico 23S (ARNr 23S), aunque también de forma menos frecuente se describen mutaciones en las proteínas ribosómicas L22 y L4 (Peyere y cols., 2016) o pueden éstas jugar un papel coadyuvante en la resistencia a macrólidos como en el caso de *E. coli* (Diner y cols., 2009). Las sustituciones, transiciones o mutaciones en el gen del ARNr 23S más comúnmente asociadas a la resistencia a macrólidos, se han identificado en A2058 y A2059 con numeración *E. coli* del gen, confiriendo ambas altos niveles de resistencia a macrólidos de 14 y 15 miembros, y resistencia de niveles intermedios en el caso de los macrólidos de 16 miembros (Peyere y cols., 2016). La transición A2057G es causa de resistencia intrínseca a eritromicina en diferentes especies de *Mycoplasma* que de forma originaria presentan G2057 (numeración de *E. coli*). Por su parte, las mutaciones que generan cambios en la secuencia de aminoácidos en las proteínas ribosomales

L22 y L4, que son menos frecuentes, conducen a su vez a bajos niveles de resistencia a macrólidos (Peyere y cols., 2016).

El caso del grupo *M. mycoides* del que forman las cepas T1/44, 8740 Rita, Abomsa y C1-95043, poseen dos operones de ARNr, *rrnA* y *rrnB* (Harasawa y cols., 2000) y las modificaciones en ellos conducentes a resistencia a macrólidos han sido menos estudiadas.

La secuencia correspondiente a la 2056-GGAAAGAC-2063 del dominio V del ARNr 23S de *E. coli*, es equivalente a la región nucleotídica G2069-C2076 en la cepa Mmm PG1, que está plenamente conservada, de manera que no existe resistencia intrínseca a macrólidos de 14 miembros en esta especie de *Mycoplasma*, tal y como se aprecia por los valores de CMI de eritromicina en las cepas T1/44, Abomsa, y C1-95403 utilizadas como cepas origen (cepas parentales para selección de mutantes). Esta sensibilidad intrínseca a macrólidos se verificó mediante las CMIs. Y tras obtener los mutantes se analizaron sus secuencias del gen 23S ARNr. En el presente trabajo de tesis, en el caso de tres colonias resistentes aisladas de Mmm T1/44 se observó una mutación en uno de los operones. Estas cepas T3, T6 y T8 presentaron un polimorfismo (A/G) en el nucleótido 2080 asociado al incremento de resistencia a eritromicina. Dicha posición se corresponde con la posición 2063 de *M. pneumoniae*, que ha demostrado producir resistencia a macrólidos (Lucier y cols., 1995; Li y cols., 2015). Y a su vez esa posición se corresponde con la 2058 de *E coli* (Gutell y Fox, 1988). Sin embargo, dicha mutación no se halló en el resto de mutantes, incluidos la cepa resistente T1 de Mmm T1/44. En esa misma cepa y en las de Mmm Rita no se encontraron diferencias entre las secuencias del gen 23S ARNr de las cepas sensibles y las resistentes. En el resto de mutantes se detectaron cambios localizados lejos

de la secuencia consenso (2056-GGAAAGAC-2063), que no se han descrito previamente asociadas a incrementos de resistencia a macrólidos. Los cambios encontrados en las cepas de Mccp se localizaron en los nucleótidos 327 y 2633 (294-295 y 2721 numeración *E. coli*) en la cepa Abomsa, mientras que en la cepa C1-95043 se encontraron en 1927 y 2032 (1904 y 2009 numeración *E. coli*). Ninguna de estas posiciones ha sido previamente asociada a incremento de resistencia a macrólidos en especies de *Mycoplasma*. Hasta ahora han sido principalmente descritas mutaciones en las posiciones 748, 2057, 2058, 2059, 2597, 2611 siguiendo la numeración de *E. coli* (Kobayashi y cols., 2005; Peyere y cols., 2016; Sato y cols., 2017), por lo tanto, distantes de los nucleótidos del gen del ARNr 23S de Mccp. Otras sustituciones en nucleótidos de la secuencia ADN del 23S ARN ribosómico se han asociado menos frecuentemente al incremento de resistencia a macrólidos, es el caso de las sustituciones en las posiciones 2503 y 2058 en mutantes de *M. gallisepticum* resistentes a tilmicosina (Wu y cols., 2005) y las sustituciones A2062G and A2062T, siguiendo la numeración de *E. coli*, asociadas a resistencia a macrólidos de 16 miembros y lincomicina en mutantes seleccionados *in vitro* con josamicina (Furneri y cols., 2001). Por lo tanto, el presente trabajo de tesis describe nuevas mutaciones en nucleótidos en el gen del ARNr 23S asociadas a incrementos de resistencia a eritromicina, con valores de CMI mayores de 0,5 µg/ml en cepas del grupo *M. mycoides*, aunque no se puede descartar la participación de otros mecanismos de resistencia concomitantes.

Para la valoración de las CMI en el extracto de *Artemisia vulgaris* L. se necesitó de la utilización del DMSO, para poder disolverlo. Se comprobó que su concentración al 25% en el extracto evaluado no interfería en el crecimiento de los micoplasmas. A su vez el extracto no

dejaba ver los cambios en la coloración del medio, por lo que la lectura de resultados se hizo en placas de medio sólido, evaluando la presencia o ausencia de crecimiento micoplásmico.

De especial interés por sus posibles implicaciones terapéuticas, fueron los resultados del presente capítulo relativos a la efectividad del extracto de los extractos de *Artemisia vulgaris* L. sobre el crecimiento de cepas de micoplasmas. Un trabajo previo de otros autores había ya demostrado la efectividad *in vitro* de extractos metanólicos de *Artemisia herba-alba* y *Artemisia arborescens* en aislamientos de cepas de MmmLC, Mcc y Mptr aisladas de ovejas y cabras con valores de CMI  $\leq 12,5$  mg/ml (Al-Momani y cols., 2007). En este trabajo de tesis se evaluó la efectividad de los extractos de *Artemisia vulgaris* L. frente a cepas de referencia Mmm, MmmLC, Mmc, Mcc, Mleach, Mcot, Myeat y Mptr, que eran sensibles a espiramicina, lincomicina y tilmicosina.

Los valores de CMI para los extractos de *Artemisia vulgaris* fueron superiores a los descritos para los extractos metanólicos de *Artemisia herba-alba* y *Artemisia arborescens* (Al-Momani y cols., 2007) con valores entre 12,5 y 50 mg/ml, lo que indica una menor actividad quizás relacionada con las propiedades antibacterianas de la especie *Artemisia vulgaris* ensayada en esta tesis.

La actividad antimicrobiana *in vitro*, no siempre se correlaciona con la actividad *in vivo*, aunque si un fármaco no demuestra actividad alguna *in vitro*, es poco probable que sea efectivo *in vivo* (Kidanimariam y cols., 2005). No obstante, dosis de extractos de *Artemisia* 100 a 600 mg/Kg de peso y día se han demostrado efectivas en el tratamiento de infecciones parasitarias por coccidios y por parásitos flagelados en pollos y gatos (Yildiz y cols., 2011; Islamuddin y cols., 2014;

Ahad y cols., 2015). Si tenemos en cuenta las concentraciones con efecto inhibitorio sobre el crecimiento de micoplasmas del grupo *M. mycoides* de este trabajo de tesis que fueron  $\geq 12$  mg/ml frente a las cepas de Mmc, Mcc y Myeat y suponiendo un volumen de distribución de aproximadamente 45-90 ml de sangre/ Kg peso para un gato cuyo peso puede oscilar 3- 5 kg, la dosis necesaria para conseguir un efecto antibacteriano eficaz en las infecciones por este tipo de micoplasmas entraría en el rango de la ensayadas con éxito en los mismos animales, 600 mg/Kg peso y día, lo que puede suponer una nueva alternativa terapéutica a considerar en micoplasmosis por especies del grupo *M. mycoides*. No obstante, para determinar su valor terapéutico sería necesario establecer la inocuidad en animales de las concentraciones ensayadas.

Sobre la determinación de los valores de CMI de macrólidos en las cepas tipo del estudio, debido a sus requerimientos nutricionales, no pudo ser llevado a cabo con Mccp. Mientras que con Mcc, se realizó mediante método modificado de difusión en disco (Poveda y Nicholas, 1998; López y cols., 2013). El solvente empleado para la disolución de la eritromicina, así como para la espiramicina, lincomicina y tilmicocina fue el apropiado (Amsterdam, 2005), ya que no interfirió en el crecimiento de los micoplasmas, ni en la acción del antibiótico. Los pocillos se cubrieron con 50  $\mu$ l de parafina para que la reacción se realizara en anaerobiosis, evitando así también evaporación de las muestras y/o contaminación de las mismas, como recomendó Antunes (2007).

En cuanto a la actividad antimicrobiana de los antibióticos ensayados, la tilmicosina fue el más efectivo inhibiendo con la menor concentración el crecimiento de los micoplasmas, como también se ha determinado en otros estudios previos en cepas del grupo *M. mycoides*

(Kidanemariam y cols., 2005; Ayling y cols., 2005; Mitchel y cols., 2013). La espiramicina fue el segundo en mejor actividad antimicrobiana, presentando valores aproximados a los descritos por Antunes y cols. (2007). Por su parte, la lincomicina fue el menos efectivo de los antibióticos ensayados. No obstante, la CMI de lincomicina previamente descrita en la misma cepa de referencia Mp<sub>tr</sub> KS1 (Antunes y cols., 2007), fue el doble de la encontrada en este estudio.

De los antibióticos macrólidos ensayados, la tilmicosina fue el más efectivo, inhibiendo el crecimiento de los micoplasmas excepto en las cepas Mleach y Mp<sub>tr</sub>, mientras que la lincomicina fue el menos efectivo. Datos contrarios a los encontrados por Tavío y cols. (2017) trabajando con *M. hyopneumoniae*, donde el antibiótico más efectivo de los tres analizados en nuestro estudio fue la lincomicina, aunque tanto en su estudio como en el nuestro los resultados indicaron que los micoplasmas eran sensibles a esos antibióticos. Sin embargo, Kidanemariam y cols. (2005) analizando CMI de macrólidos, encontró que las cepas de campo de MmmLC presentaban valores mucho más altos de CMI a la espiramicina (>4 µg/ml), si bien ese antibiótico ha sido ampliamente utilizado contra la pleuropneumonía contagiosa bovina en la región de estudio. Otros estudios, han demostrado que la combinación de lincomicina y la espectinomicina (aminoglicósido) tuvo un resultado diferente a su uso por separado, reduciendo los valores CMI con su uso conjunto (Handy y Blanchard, 1970).

El estudio en medio sólido en Mcc mostró unos valores más elevados para todos los antibióticos, en el caso de la espiramicina se necesitó una concentración de 2.5 µg/ml para que se viese inhibido el crecimiento alrededor del disco. Este es un valor 41 veces superior al precisado por el resto de micoplasmas en medio líquido. Mcc sólo pudo ser evaluado mediante

la técnica de difusión en placa, sin embargo, MmmLC se analizó mediante este método y el de la microdilución en placa. En su caso cabe destacar la mayor concentración necesaria para calcular inhibición en el crecimiento usando la metodología en placas con discos impregnados, en la cual se enfrentan los valores obtenidos desde placas de microdilución (medio líquido) y placas con discos impregnados en el antibiótico (medio sólido). Siendo 41 y 6 veces mayor la concentración requerida de espiramicina y lincomisina repectivamente, si bien para la tilmicosina los valores obtenidos fueron similares.

Acerca del estudio de la conservación de la efectividad de los antibióticos en el tiempo, con los tres macrólidos analizados observamos un aumento en las concentraciones requeridas para inhibir el crecimiento a los 60 y 180 días posteriores a la preparación del antibiótico, indicando la degradación de los mismos. Siendo por ejemplo este aumento para la lincomicina en Mptr desde 0,5 µg/ml del día de la preparación de la solución a valores de 1 µg/ml a los 60 días y 2 µg/ml a los 180 días.

## **Capítulo 4**

Aislamiento de un nuevo micoplasma de  
dromedario en las Islas Canarias

---



#### 4.1. Introducción

Los camélidos se dividen en dos grandes grupos: los que presentan joroba y los que no. Los primeros también se conocen como camélidos del Viejo Mundo y engloban a los dromedarios, camellos bactrianos y camellos salvajes, mientras que los segundos se encuentran en el Nuevo Mundo e incluyen a las llamas, alpacas, vicuñas y guanacos. En contra de la creencia popular, los camélidos (F/ *Camelidae*) aunque ejercen el acto de rumiar, no son rumiantes taxonómicamente hablando y no pertenecen al Suborden *Rumiantia*, sino al Suborden *Tylopoda* (del latín “*tilo*”: callos y “*poda*”: en los pies), por lo que se les considera pseudo-rumiantes. Poseen callos, en vez de pezuñas o cascos, carecen de estómago aglandular y tampoco tienen cuernos (Schulz, 2008).

El dromedario (el que corre, en griego) es el camello de una joroba y es una versión más ligera de el camello bactriano (de dos jorobas). Su nombre científico es *Camelus dromedarius* y está tan extraordinariamente adaptado al clima árido que no soporta muy bien la humedad. Existen alrededor de 17 millones de ejemplares en el mundo y es a nivel ganadero, la única especie de *Tylopoda* en Canarias (Schulz, 2008).

La distribución mundial del dromedario se encuentra concentrada en el norte de África y el sudoeste de Asia. Y aunque en el pasado se introdujeron además en muchos países alrededor del globo terráqueo, después de un corto periodo de tiempo desaparecieron de todos ellos, menos en Australia y España (Canarias). El dromedario es un animal muy polivalente y como ganado doméstico ha servido al hombre en su tiempo libre como ocio, trabajo y transporte, además de como especie de abasto (Schulz, 2008). Estos animales fueron introducidos por primera vez en las Islas Canarias hace unos seis siglos, procedentes de la cercana costa africana,

como ayuda en las labores del campo, sin embargo, hoy en día son empleados principalmente en la industria turística (Gutiérrez y cols., 2005; Gutiérrez y cols., 2010).

El Archipiélago Canario posee la mayor población de camellos existente en Europa, presentando un censo aproximado de unos 2,000 dromedarios (Gutiérrez y cols., 2005), siendo éste el principal punto de importación de estos animales al continente europeo y a América Latina (Mentaberre y cols., 2013). Actualmente la reproducción es la única forma de conservación del dromedario en Canarias ya que no se importan (Schulz, 2008).

Los dromedarios, como cualquier ser vivo, pueden infectarse de microorganismos infecciosos, pudiendo padecer las enfermedades o convertirse en portadores asintomáticos. Hay enfermedades contagiosas propias de los camellos y otras que comparte con otros mamíferos, incluido el hombre. Cada día el conocimiento sobre las enfermedades de camélidos aumenta (Schulz, 2008) y paralelamente también se han desarrollado avances en la medicina de camellos (Wernery y Kaaden, 2002). Las enfermedades transmisibles incluidas en la OIE que pueden afectar a los camellos se encuentran listadas en la **tabla 4.1**. Desde 1997 está prohibido el movimiento de ganado con el Norte de África, debido a la aparición en el Magreb de casos de Fiebre Aftosa. Esta medida ayuda a su vez a mantener el estatus de libre de lengua azul y brucelosis (Schulz, 2008). La enfermedad que sí se ha detectado en Canarias y que además es la enfermedad que más importancia tiene en camellos es la tripanosomosis (Gutiérrez y cols., 2005).

Sin embargo, se dispone de poca información concerniente a los micoplasmas (Cl/*Mollicutes*) y micoplasmosis en estos animales. Si bien, Elfaki y cols. (2002) aislaron *M. arginini* de

lesiones de neumonía en camellos, mientras que Wernery y Kaaden (1995) aislaron *Acholeplasma (A.) laidlawii* y *A. oculi* de animales sanos. Algunos estudios intentaron relacionar la presencia de micoplasmas en articulaciones artríticas en estos animales con resultados infructuosos (Bani Ismaili y cols., 2007).

Bacterianas	Víricas	Parasitarias
Brucelosis Carbunco bacteridiano Leptospirosis Paratuberculosis Salmonelosis Fiebre Q Tuberculosis Campylobacteriosis Genital Bovina Seoticeemia Hemorrágica Clamidiosis Muermo	Fiebre Aftosa Fiebre del Valle del Rift Peste Equina Rinoneumonitis Equina Lengua Azul Rabia Viruela del Camello Diarrea Viral Bovina Rinotraqueítis Infecciosa Bovina/ Vulvovaginitis Pustular Infecciosa Peste de los Pequeños Rumiantes Fiebre del Nilo Occidental	Hidatidosis Miasis Tripanosimosis Anaplasmosis bovina

**Tabla 4.1.** Enfermedades transmisibles incluidas en la OIE que pueden afectar a los camellos (Schulz, 2008).

Otra forma de investigar la presencia de micoplasmas en camellos es mediante la serología, ofreciendo resultados positivos en varios casos, tales como *M. mycoides* subsp *mycoides* tipo SC, agente etiológico de la pleuroneumonía contagiosa bovina, mediante la utilización de “dot enzyme immunoassay” y “Western blots” (Egwu y Aliyu, 1997). También se han obtenido resultados serológicos positivos mediante test de fijación del complemento para el agente causal de la pleuroneumonía contagiosa caprina, *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* (Paling y cols., 1978). Mientras que *M. mycoides* subsp. *capri*, causante de enfermedades respiratorias en el ganado caprino, fue detectado mediante inmuno-electroforesis (Ur-Rahman y cols., 2006). No obstante, algunos de estos resultados no pudieron ser confirmados en los mismos estudios utilizando otras pruebas serológicas como el complejo de fijación (Egwu y Aliyu,

1997) y el test de hemoaglutinación indirecta (Ur-Rahman y cols., 2006). Además, en otros estudios no se detectaron anticuerpos frente a *M. agalactiae* ni a *M. mycoides* subsp. *mycoides* tipo LC, renombrado como *M. mycoides* subsp. *capri*, usando un ELISA indirecto (De la Fe y cols., 2009b). Este último resultado sugiere que los camellos, en ese caso, no actúan como portadores de los principales agentes causantes de agalaxia contagiosa en la isla de Lanzarote (Islas Canarias).

No obstante, los camélidos en general podrían tener un papel como reservorios de micoplasmosis de rumiantes, pudiendo existir la posibilidad de que estos animales jueguen un papel decisivo en el mantenimiento y dispersión de las micoplasmosis que afectan a rumiantes de abasto, en aquellas regiones donde existe una estrecha relación de convivencia entre los camélidos y dichos rumiantes. Ante la posibilidad de que los camélidos puedan actuar como reservorios de los micoplasmas causantes de enfermedad en el ganado caprino y bovino, tales como Mmc, Mmm, *M. agalactiae* etc., se diseñó este trabajo. Porque se consideró que micoplasmas conocidos de rumiantes podrían ser aislados de camélidos.

## **4.2. Material y métodos**

El estudio fue realizado en dos fases diferentes.

### **4.2.1. Primera fase.**

#### **4.2.1.1. Toma de muestras y condiciones de cultivo.**

En la primera de ellas se trató de probar el aislamiento de micoplasmas desde diferentes localizaciones corporales de dromedarios vivos. Los animales muestreados para el estudio pertenecían a una granja ubicada en el sur de la isla de Gran Canaria, Islas Canarias, España, que

cuenta con un censo aproximado de 150 animales. Los dromedarios se encontraban en un estado de salud aparentemente sano.



Figura 4.1. Toma de muestra de vagina de dromedaria con bastoncillo estéril.

Muestra	Oído		Boca		Ojo		Vagina			
	PH	RPMI	PH	RPMI	PH	RPMI	PH	RPMI	SP4-II	urea
Animal										
Jámara	3*	4	1	2		2		2		5
Sahara 8347	1	1	2		1		2		1	4
Silvia	1	1			1	1		1		
Desconocida							1		1	4
Mancha ojo							1		1	7
Macho 1	1									
Macho 2	1									
Macho 3	1									

Tabla 4.2. Tabla de las muestras tomadas en la primera fase del estudio. \*Número de muestras tomadas.

Todas las muestras fueron tomadas con hisopos estériles (**Figura 4.1**). Así, se tomaron muestras de oídos, conjuntiva, boca y vagina de cinco hembras de dromedario y se inocularon en diferentes medios de cultivo tales como medio PH (Kirchhoff y Rosengarten, 1984), PH medio suplementado con un 10% de urea, SP4-II (Ramírez y cols., 1997) y RPMI (Gibco), y de conjuntiva de tres machos de dromedario en medio PH, hasta llegar a un total de 28 muestras (**tabla 4.2**).

El transporte de las muestras se hizo en un plazo máximo de 3 horas, conservándolas a temperatura ambiente. Una vez llegaron al laboratorio los tubos fueron incubados a 37°C durante 24 horas. Pasado ese tiempo, las muestras se filtraron a través de filtros con membranas estériles de diámetro de poro de 0.45 µm, siendo subcultivadas en el mismo medio de cultivo del que procedían (PH medio, PH + urea medio, SP4-II medio o RPMI + suero de caballo). Los medios se controlaron diariamente hasta observar indicios de crecimiento durante un tiempo máximo de dos semanas. En cuanto dichos cambios fueron observados (turbidez y color), se llevó a cabo la extracción de ADN y se hicieron subcultivos en medio sólido (PH agar) para confirmar el crecimiento, mediante la visualización de colonias a través de la observación de las placas con un microscopio óptico. Aquellas muestras donde no se apreció crecimiento se consideraron negativas y los tubos fueron desechados. Por el contrario, aquellas muestras cuyas placas evidenciaron crecimiento, fueron subcultivadas en medio SP4-II (Ramírez y cols., 1997), para posteriormente clonar colonias por triplicado para obtener un cultivo puro de los aislamientos, siguiendo el método descrito por Tully (1983).

#### 4.2.1.2. Pruebas bioquímicas

La evaluación de la inhibición de crecimiento de las colonias con digitonina se llevó a cabo tal y como Poveda y cols. (1998) describieron. Además, el perfil bioquímico de los cultivos fue evaluado analizando la fermentación de la glucosa y la manosa, la hidrólisis de la arginina y la urea y la reducción del cloruro de tetrazolium (Poveda y cols. 1998). La producción de películas y cristales fue comprobada en placas de medio SP4-II.

#### 4.2.1.3. Extracción de ADN y PCR

El ADN de los cultivos antes y después de clonados fue extraído utilizando la extracción con sílica descrita por Tola y cols. (1997). La PCR para la obtención de la región intergénica 16-23S ARNr (ISR) siguió el protocolo descrito previamente por Ramírez y cols. (2008a), las PCRs del gen que codifica el ARNr 16S fue llevada a cabo siguiendo el método de Yavari y cols. (2010), mientras que las PCRs del gen del ARNr 23S están descritas por Ramírez y cols. (2007). Los cebadores y protocolos utilizados son los mismos descritos en el capítulo 2 (**Tablas 2.2, 2.3, 2.4 y 2.5**). Otra PCR que también se utilizó fue la descrita por van Kuppeveld y cols. (1992 y 1994), con ella se obtuvo productos de PCR de una parte del gen 16S ARNr. El protocolo utilizado fue el mismo descrito en la **Tabla 2.3**, pero con los siguientes cebadores: GPO3 (5' GGGAGCAAACAGGATTAGATAC CCT 3') y MGSO (5' TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC 3').

Las PCRs fueron realizadas en un termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf) utilizando *illustraTMPureTaqTM Ready-to-GoTM PCR beads* (GE Healthcare), 1 µl (20 µM) de cada cebador, 3 µl de muestra, y agua *PCR-grade* (Sigma). 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), para posteriormente visualizarlo en un transiluminador (Bio-Rad).

#### **4.2.1.4. Secuenciación y análisis de las secuencias**

Antes de mandar las muestras a secuenciar, se limpiaron con el kit de limpieza de PCR (Cycle Pure Kit, OMEGA bio-tek). La secuenciación se llevó a cabo en el "Servicio de Genética y Diagnóstico Molecular" de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (España), utilizando la química BigDye v 3.1 (Applied Biosystems) con un secuenciador ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems). Se secuenciaron ambas hebras de ADN de cada producto de PCR al menos por duplicado.

Los cromatogramas resultantes se examinaron mediante el programa informático Finch TV (versión 1.3.1 Geospiza Inc.). Las secuencias consenso se obtuvieron a partir de la comparación de las secuencias de avance y retroceso complementarias utilizando la herramienta GeneRunner (versión 3.05; Hastings Software, Inc.). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias registradas en el GeneBank, para lo que se utilizó el programa BLAST SEARCH ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)) (Bilofsky y Burks, 1988; Altschul y cols., 1997). La construcción del dendrograma a partir de las alineaciones de las secuencias del gen que codifica para el gen 16S ARNr se llevó a cabo utilizando el programa "Molecular Evolutionary Genetics Analysis" (MEGA) de versión 4.0 (Tamura y cols., 2007). Las secuencias utilizadas en la construcción del dendrograma se muestran en la **Tabla 4.3**.

Especie	Cepa	Nº de acceso
<i>M. bovigentialium</i>	PG11 <sup>†</sup>	AY121098
<i>M. californicum</i>	ST-6 <sup>†</sup>	M24582
<i>M. simbae</i>	ATCC 49888 <sup>†</sup>	U16323
<i>M. phocirhinis</i>	852 <sup>†</sup>	AF304324
<i>M. mucosicanis</i>	1642 <sup>†</sup>	AM774638
<i>M. sp. Mirounga</i>	ES2805-ORL	GU905031
<i>M. sp. Jamara</i>	1	HF548852X
<i>M. fermentans</i>	PG18 <sup>†</sup>	M24289
<i>M. spermatophilum</i>	AH159 <sup>†</sup>	AF221119
<i>M. iners</i>	PG30 <sup>†</sup>	AF221114
<i>M. lipofaciens</i>	R171 <sup>†</sup>	AF221115
<i>M. opalescens</i>	MH5408 <sup>†</sup>	AF221117
<i>M. bovis</i>	Donetta <sup>†</sup>	U44767
<i>M. felifaucium</i>	PU <sup>†</sup>	U15795
<i>M. leopharyngis</i>	LL2 <sup>†</sup>	U16760
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i>	PG1 <sup>†</sup>	U26038

**Tabla 4.3.** Secuencias utilizadas en la construcción del dendograma y sus números de acceso.

#### 4.2.2. Segunda fase.

Debido a la detección de micoplasmas en las secreciones vaginales de dromedario, el diseño de la segunda fase del estudio se basó en la búsqueda de más aislamientos en dicha región corporal de dromedarias.

En esta segunda parte del trabajo se muestrearon 22 animales de la misma granja más una muestra adicional de otro animal procedente de otra granja. Esta segunda granja tenía un censo de unos 60 animales. Se tomaron un total de 59 muestras de vagina con la ayuda de hisopos estériles. Todas las muestras fueron tomadas en medio PH suplementado con un 10% de urea. La información sobre la edad de los animales, si estaban o no gestantes y el estado de salud de los mismo fue registrado cuando esta información estuvo disponible (**Tabla 4.4**).

#### 4.2.2.1. Toma de muestras y condiciones de cultivo

Animal	Nº Muestras	Edad (años)	Estado
1	1	-	
3	1	-	
4	1	-	
5	1	-	
X10	1	-	
La Coja	6	6-12	
8609	9	15-18	
8992-negra	1	15-18	Preñada
Gorda	4	12	Preñada
GC 2728-A	4	-	
Ultima camella	3	8-9	No preñada
Argolla nariz	3	18	
8614	3	12-13	Lactante, no preñada
8604	3	17	Preñada
Fatima (5720)	3	20	No preñada
GC272817	3	18	Lactante con la cría, no preñada
Zeluca	2	6-12	
Antonia	2	6-12	
Hastigma	2	6-12	
La flaca	2	6-12	
Sahara libre	2	6-12	
Sahara no libre	2	6-12	
Crotal verde	2	6-12	

**Tabla 4.4.** Tabla de las muestras tomadas de vagina de dromedaria en la segunda fase del estudio.

Al igual que en la primera fase, las muestras se incubaron a 37°C antes de transcurridas tres horas desde su toma. Pasadas 24 horas, los cultivos se filtraron a través de membranas estériles con un diámetro de poro de 0,45 µm, siendo el medio de cultivo al que se pasaban, el SP4-II. Una vez filtrados, los cultivos se mantuvieron en incubación a 37 °C, y se controlaba diariamente la posible aparición de indicios de crecimiento, como la aparición de turbidez y/o

cambio del indicador de pH. Los casos positivos fueron subcultivados para su posterior clonaje, PCR y secuenciación. El crecimiento observado en medio líquido fue además comprobado mediante el subcultivo y la visualización de colonias en medio sólido, SP4-II agar.

#### **4.2.2.2. Extracción de ADN y secuenciación**

En esta fase del trabajo solo se extrajo el ADN a aquellas muestras que dieron un resultado positivo al crecimiento (Tola y cols., 1997). Solamente se hizo la PCR de la ISR (Ramírez y cols., 2008a) y los productos obtenidos se mandaron a secuenciar.

La secuenciación y el análisis de las secuencias se llevaron a cabo de la misma manera que para la primera fase del estudio. Además, se compararon las nuevas secuencias con las ya obtenidas en la fase previa.

#### **4.2.3. Almacenamiento de los cultivos**

En cuanto a la conservación de las cepas aisladas, éstas fueron cultivadas en medio SP4-II líquido. Al alcanzar la fase estacionaria de crecimiento se les añadió un volumen equivalente de una solución crioprotectora. Esta solución se componía de suero de caballo inactivado y con una proporción de inositol del 5%. La mezcla del cultivo y la solución fue dispensada en viales de liofilización, en condiciones de esterilidad. Estos viales se enfriaron durante 24 horas a -80°C y finalmente liofilizados en un liofilizador (Telstar, CRYODOS 45). Las cepas liofilizadas permanecieron almacenadas en refrigeración a 4°C para su uso posterior.

Otro método de conservación de los aislamientos es mediante su criogenización, para la cual se sigue la misma metodología que en el caso de la liofilización, con la salvedad de que en

este caso empleamos tubos de un volumen máximo de 2 ml, los cuales son introducidos directamente en el congelador a -80°C.

### 4.3. Resultados

De las 23 muestras tomadas en la primera fase del estudio se extrajo el ADN de las siguientes muestras por presentarse turbidez en el medio de cultivo: dos muestras de vagina de Jámara, tres muestras de vagina de Sahara (8347) todas en medio de pH suplementado con 10% de urea, mientras que la muestra de oído y otra de boca de Jámara y una muestra de oído de Sahara (8347) estaban en medio PH. A su vez los cultivos fueron subcultivados a medio PH líquido, con y sin suplemento de urea, y a medio SP4-II, así como también se sembró en medio PH agar para comprobar la formación de colonias típicas de micoplasmas.

Solamente se consiguieron ver colonias típicas de micoplasmas en una única muestra, la procedente de secreción vaginal en medio PH suplementado con un 10% de urea de la dromedaria Jámara. Tras 72-96 h se pudieron observar colonias con la morfología típica de “huevo frito”. Debido a la imposibilidad de mantener los aislamientos en un medio de cultivo diferente al SP4-II, se continuó trabajando con este medio durante el resto del estudio. Una vez el micoplasma se adaptó a dicho medio, las colonias fueron visibles unas 48 horas después de la inoculación. El aislamiento fue clonado y nombrado de forma coloquial como *Mycoplasma (M.)* sp. Jámara-1 (**figura 4.2**).

La cepa Jámara-1 fue sensible al test de la digitonina, por lo que podemos deducir que la presencia de esteroides en el medio de cultivo es un requisito indispensable para su crecimiento, y que, por tanto, quedaría englobada en la clase *Mollicutes*, dentro del orden de los

*Mycoplasmatales*. En cuanto a los resultados bioquímicos, la arginina fue hidrolizada, pero no así la urea, lo cual indica que la cepa aislada no es un *Ureaplasma*, lo que sumado a lo anterior parece delimitar taxonómicamente a este nuevo micoplasma dentro del género *Mycoplasma*. En el caso de los restantes metabolitos analizados (glucosa, manosa y tetrazolium) los resultados fueron negativos, así como la producción de películas y cristales en las observaciones realizadas del cultivo en medio sólido.



**Figura 4.2.** Colonias de *Mycoplasma* sp. cepa "Jámara-1" mostrando la típica forma de huevo frito.

El ADN fue extraído con éxito de la muestra clonada (*M. sp* Jámara-1) procedente de vagina de la dromedaria Jámara, pudiéndose así obtener los productos del gen 16S ARNr 16S. Estos productos enviados a secuenciar tras su purificación, obteniéndose cromatogramas de gran calidad, a partir de los cuáles se obtuvo una secuencia consenso del gen 16S del ARNr virtualmente completa (**tabla 4.5**).

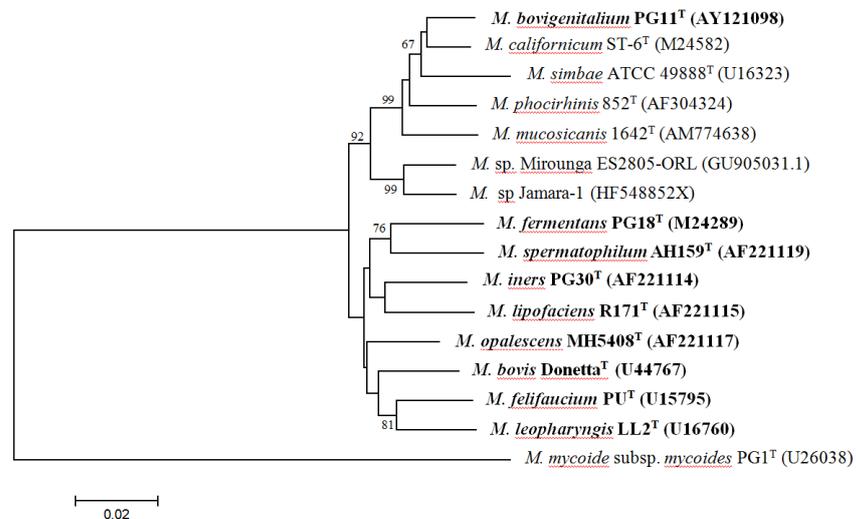
Tras realizar una búsqueda con el programa BLAST SEARCH, la similitud mayor hallada con esta secuencia fue del 97% con *M. sp. Mirounga* ES2805-ORL y del 96% con *M. californicum*, *M. bovigentialium*, entre otros (Tabla 4.6).

Secuencia 16S ADNr cepa Jámara-1
AACGCTGGCTGTGTGCCTAATACATGCATGTCGAGCGAAGTACTTGTACTTAGCGGCGAATGGGTG AGTAACACGTGCTCAACGTACCCCTTCAGATTGGGATAGCGGCTGGAAACAGCCGATAATACCAAAT ACCCGTAGGTTTCGCATGAAGCTTACGTAAAAGGCGCGTTTGCGCCGCTGGAGGATCGGGGTGCCG AACATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAACGGCCACCAAGGCTACGATGTTTAGCGGGGTTGAGAGACTG AACCGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATATTTCCA CAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCGACACAGCGTGAAGGATGAAGGCCCATGGGTTGTAACTTC TGTGGTAAGGGAAGAAAAAGTAGTGTAGGAAATGCCACTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCA ACGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGTAATACATAGGTTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGG CGTAAAGCGTCTGTAGGTTGTTTGTAAAGTCTGGCGTTAAATTTGGGGCTCAACCCCAAACCTGCG TTGGATACTGGCAGGCTAGAGTTGTGTAGAGGTAAGCGGAATTCCTTGTGAAGCGGTGAAATGCGT AGATATAAGGAAGAACACCAAAAATGGCGAAGGCAGCTTACTGGGCATATACTGACACTGAGAGACG AAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGATCATTAGCT GATGGAGAATTCGTCGGCCAGCTAACGCATTAATGATCCGCCTGAGTAGTACGTTCCGCAAGAAT AAAACTTAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTTGAAGATACG CGTAGAACCTTACCCTCTTGACATCTTCCGCAAAGCTATAGAGATAAGTGGAGGTTAACGGAA TGACAGATGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTCCGTTAAGTCTGCAACGAGC GCAACCCCTTATCCTTAGTTACTAATCATTGAGTCTAGGAGACTGCCCGAGTAATCGGG AGGAAGGTGGGACGACGTCAAATCATCATGCTTACGAGTGGGGCAACACAGTGCATACAATG GTCGGTACAAAGAGAAGCAACCTGGTGACAGTGAAGCAACCTCAAAAAACCGATCTCAGTTCGGAT TGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCTACGTTACGGT GAATACGTTCTCGGGTCTTGTACACACCCGCCCTCAAAACCATGGGAGCTGGTAATGCCCGAAGTGC GTTTATTAACAACTGCCAAGGCAGGACTGGTACT

Tabla 4.5. Secuencia del gen 16S del ARNr de la cepa *Mycoplasma* sp. Jámara-1.

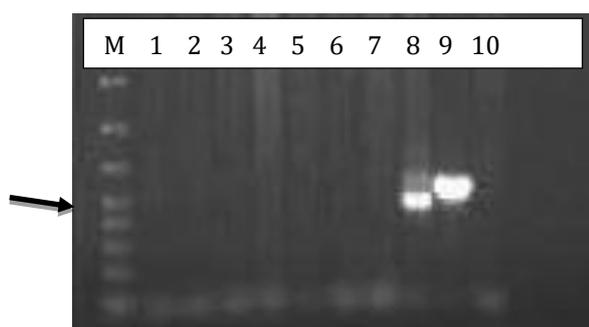
Accession	Description 16S ADNr	Query coverage	Max ident
<a href="#">GU905031.1</a>	<i>Mycoplasma</i> sp. Mirounga ES2805-ORL	100%	97%
<a href="#">AB576869.1</a>	<i>Mycoplasma californicum</i> clone: NIAH1	100%	96%
<a href="#">AY121108.1</a>	<i>Mycoplasma</i> sp. 'ovine/caprino serogroup 11' isolate 95SR99	100%	96%
<a href="#">AY121098.1</a>	<i>Mycoplasma bovigentialium</i> strain PG 11	100%	96%
<a href="#">GU905023.1</a>	<i>Mycoplasma</i> sp. Mirounga ES2806-GEN	100%	96%
<a href="#">AY121104.1</a>	<i>Mycoplasma</i> sp. 'ovine/caprino serogroup 11' isolate 48SR98	100%	96%
<a href="#">AY121094.1</a>	<i>Mycoplasma</i> sp. 'ovine/caprino serogroup 11' strain 2D	100%	96%
<a href="#">AY121109.1</a>	<i>Mycoplasma bovigentialium</i> isolate 398/87	100%	96%
<a href="#">AY121103.1</a>	<i>Mycoplasma</i> sp. 'ovine/caprino serogroup 11' isolate 3SR99	100%	96%
<a href="#">AY121097.1</a>	<i>Mycoplasma bovigentialium</i> isolate 988/80	100%	96%
<a href="#">AY121100.1</a>	<i>Mycoplasma</i> sp. 'ovine/caprino serogroup 11' isolate 126SR99	100%	96%

Tabla 4.6. Resultado del análisis del BLAST SEARCH del gen 16S del ARNr de la cepa de *Mycoplasma* sp. Jámara-1 con los micoplasmas con una mayor similitud.



**Figura 4.3.** Árbol filogenético basado en las secuencias del gen 16S ARNr, mostrando la filogenia representativa del grupo *M. bovis* (Grupo *Hominis*), pero con énfasis en el subgrupo *M. bovigentalium*. *M. mycoides* subsp. *mycoides* PG1<sup>T</sup> del Grupo *Spiroplasma* sirvió de grupo externo. Los números de acceso al GeneBank de las secuencias se encuentran dentro de los paréntesis. La barra significa que hay 0.02 sustituciones por posición de nucleótido.

Filogenéticamente la cepa aislada queda incluida dentro del grupo *M. hominis*, en el grupo *M. bovis* y, más específicamente, en el subgrupo *M. bovigentalium*, siendo *M. bovigentalium* el micoplasma de este grupo con el que tiene una mayor similitud (97%). En la **figura 4.3** se muestra el árbol filogenético incluyendo la cepa *Mycoplasma* sp. Jámara-1 junto a los micoplasmas del subgrupo *M. bovigentalium* y los representantes de los subgrupos del grupo *M. bovis*. El grupo *M. sp. Jamara-1* está agrupado específicamente con *M. sp. Mirounga* ES2805-ORL, micoplasma aislado de un elefante marino del norte (*Mirounga angustirostris*). Dichas especies mostraron una similitud del 97% en función a la secuenciación del 16S ARNr, mientras que las similitudes con los otros micoplasmas fueron iguales o inferiores al 96%.

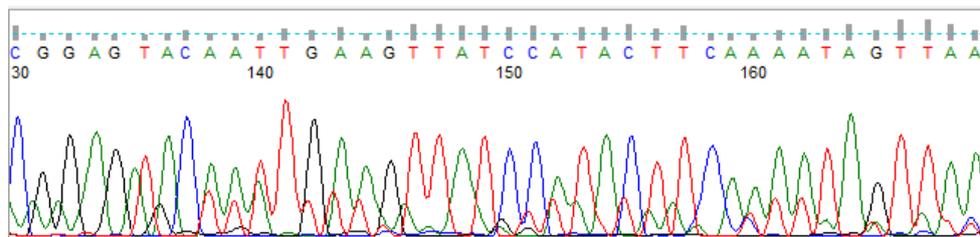


**Figura 4.4.** Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos de PCR de la ISR. Muestras de derecha a izquierda: M: marcador; 1: vagina Jámara; 2: vagina Sáhara (8347) (1); 3: vagina Sáhara (8347) (2); 4: vagina Sáhara (8347) (3); 5: oído Jámara; 6: boca Jámara; 7: oído Sáhara (8347); 8: vagina Jámara (medio de pH suplementado con 10% de urea); 9: *M. sp. Jámara-1* clonado; 10: control (-). La banda señalada con la flecha marca 400 pares de bases.

La PCR de la ISR se llevó a cabo tanto en extracciones de ADN de muestras sin clonar como clonados. En la **figura 4.4** podemos ver que las únicas muestras que dan un producto de ISR son la 8 (vagina Jámara en medio de pH suplementado con 10% de urea) y la 9 (*M. sp. Jámara-1*, clonado). El primer caso se trata de una muestra de ADN extraída de un cultivo sin clonar y se pueden apreciar dos bandas con diferentes pesos moleculares, una de un peso de unos 400 pb y otra ligeramente mayor en la muestra. La secuencia más corta produjo una banda más brillante. Esta característica permitió mandar los productos de PCR a secuenciar, ya que dicha banda produjo una secuencia dominante (**figura 4.5**), lo cual nos permitió obtener dicha secuencia (**tabla 4.7**).

Tras realizar un análisis de similitudes con el programa BLAST se obtuvieron unas similitudes del 90% al 91% con *M. indiense* y *M. orale* respectivamente. Ambas especies pertenecen al grupo *Hominis* y grupo *M. hominis*, presentando un porcentaje de similitud entre

ellas del 92%. Esta cepa, al constatarse que era diferente de *M. sp. Jamara-1*, se nombró como *M. sp. Jamara-2*.

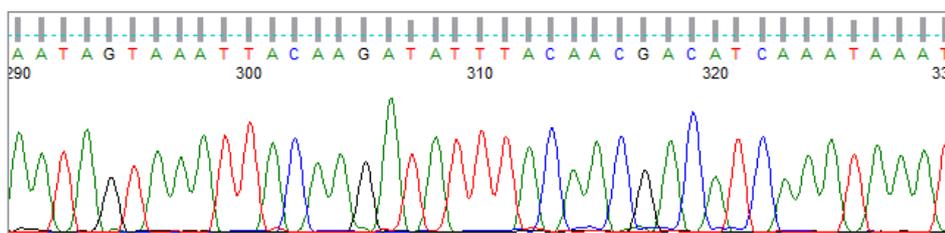


**Figura 4.5.** Cromatograma de las ISRs de la muestra obtenida de vagina de la dromedaria Jámara, donde se pueden apreciar dos secuencias de las cuales la correspondiente a la cepa *Mycoplasma sp. Jámara-2* es la dominante. A: adenina; C: citosina; G: guanina; T: timina.

Secuencia ISR cepa Jámara-2
CCATGGGAGCTGGTAATACCCAAAGTCGGTTTGCTAACCTCGGAGGCGACTGCCTAAGGTAGGAC TGGTGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTATCCCTACGAGAACGTGGGGATGGATTACCTCCTTT CTACGGAGTACAATTGAAGTTATCCATACTTCAAAATAGTTAATGGCCCAATATTCGTATCCAGT TTGAGAGAACTACTCTCTCTTTTATTCTTTGAAAACCTGAATTAGACATTGAAAATTAATATTT AATATTCAAAATTTAGATCAACCTATAGAATATTCAAAATATAACAAAACAATAGGTCAATAC TTATACGTTAAATATATATATATAACTATTAATAAGCAAGAGTTTTTGGTGGATGCCTTGGGT CTGGAAGTCGATGAAGGA

**Tabla 4.7.** Secuencia de la cepa *Mycoplasma sp. Jámara-2* incluyendo el extremo 3' del gen 16S del ARNr y la ISR (nucleótidos en negrita).

Sin embargo, una vez se clonó la muestra, se pudo obtener un único producto de la PCR de la ISR de todos los clones que se realizaron con el mismo peso molecular que la banda más larga de la muestra no clonada (**figura 4.4**), la muestra procedente de *M. sp. Jamara-1*. En el proceso de clonación se había perdido la cepa *M. sp. Jamara-2*. La ISR de la secuencia más larga (*M. sp. Jamara-1*), al tener un cromatograma limpio (**figura 4.6**), se obtuvo su secuencia sin ningún problema (**tabla 4.8**), dando una similitud del 78% *M. lipofaciens* y del 77% para *M. fermentans* (grupo *Hominis*, grupo *M. bovis*).



**Figura 4.6.** Cromatograma de la ISR del micoplasma cultiva de vagina de la dromedaria Jámara (cepa *M. sp.* Jámara-1). A: adenina; C: citosina; G: guanina; T: timina.

Secuencia ISR cepa Jámara-1
ACACACCGCCCGTCAAACCATGGGAGCTGGTAATGCCCGAAGTCGGTATTATTAACAAACTGCCTA AGGCAGGACTGGTGACTGGGGTTAAGTCGTACAAGGTATCCCTACGAGAACGTGGGGATGGATC ACCTCCTTT <b>CTACGGAGTACAAAAGAGCTTATTTTAATAAGTTATTAACCTTTAATTATCAGACC</b> <b>TAATTTTGGATGTTTTAGTATAAAACAATAATTTGTCATGCGTTTCTTTATAGGCTAAGAACA</b> <b>ATATATCTAGTTTTGAGAGGACAAATCTCTCAATTGTTCTTTGAAAACCTGAATAGTAAATTCAA</b> <b>GATATTTACAACGACATCAAATAAATAAATAAATAAATGTTAATTTGTTTGGATTCATCGAG</b> <b>TAATCATTAAATATGATTCATTAAATCTTTTAAATAAG</b>

**Tabla 4.8.** Secuencia de la cepa *Mycoplasma sp.* Jámara-1 incluyendo el extremo 3' del gen 16S del ARNr, la ISR y extremo 5' del gen 23S del ARNr (nucleótidos en negrita).

Al comparar las secuencias obtenidas de la ISR de las dos cepas detectadas en vagina de la dromedaria Jámara (**figura 4.7**), se obtuvo un porcentaje de similitud del 48,9%.



**Figura 4.7.** Alineamiento de las secuencias de la ISR de las dos cepas detectadas en vagina de la dromedaria Jámara: *M. sp.* Jámara-1 y *M. sp.* Jámara-2. El porcentaje de similitud es de un 48,9%. A: adenina; C: citosina; G: guanina; T: timina.

A su vez, se realizó la PCR de van Kuppeveld y cols. (1992 y 1994) con las mismas muestras de cultivos no clonados analizadas anteriormente con la PCR de la ISR (figura 4.4). Se obtuvieron productos de PCR de la muestra de vagina y de la muestra de oído de Jámara. Se detectó doble secuenciación en la primera muestra que no pudo ser analizada y una secuencia única de buena calidad de la muestra de oído de Jámara (tabla 4.9). Tras el análisis de la secuencia se concluyó que los micoplasmas con los que presentaban una mayor similitud eran *M. indiense* y *M. orale* con un 98%. Los mismos micoplasmas con la similitud más cercana a *M. sp. Jamara-2*. Y al igual que no se consiguió cultivar dicha cepa en medios de cultivo, también ocurrió lo mismo con la muestra de oído. Ambas muestras parecen pertenecer a la misma cepa.

**Secuencia parcial 16S ADNr cepa Jámara-2**

```
GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGATCATTAGTCGGTAGAAACTACTGACGCAGCTAACGC
ATTAAATGATCCGCCTGAGTAGTATGCTCGCAAGAGTGAAACTTAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGG
TGGAGCATGTGGTTAATTTGAAGATACGCGGAGAACCTTACCCACTCTTGACATCCTTCGCAAAGCTATAGAG
ATATAGTGGAGGTTAACAGAGTGACAG
```

**Tabla 4.9.** Secuencia parcial del gen 16S del ARNr (van Kuppeveld y cols., 1992 y 1994) de la muestra de oído de la dromedaria Jámara. Se cree que se corresponde con la cepa *Mycoplasma sp. Jámara-2*.

El gen 23S del ARNr de la cepa *M. sp. Jámara-1* también se secuenció satisfactoriamente y se muestra en la tabla 4.10, dando tras el análisis con el programa Blast una similitud del 94% con *M. fermentans*.

En la segunda fase del estudio, de las 23 muestras tomadas de vagina, 10 dieron resultado positivo por PCR, pudiéndose cultivar micoplasmas en 9 de estas 10 muestras. El producto de PCR de la ISR de estas diez muestras se pudo obtener, dando el mismo peso molecular que para *M. sp. Jamara-1* (figura 4.8). También las pruebas bioquímicas dieron el mismo perfil que para la cepa *M. sp. Jamara-1*.

Secuencia 23S ADNr cepa Jámara-1
<p>CTTTTAAATAAGTAAGAGTTTGTGGTGGATGCCCTTGGGCTCGAAGTCGATGAAGGACGTGATTACCTGCGATA                  AGCCTTGTGAGCTGGAATAAGCTGTGAAACAGGGATTTCCGAATGGGGAAACCTAACTAGAGTAATGTCTAG                  TTGCCATATTTGAATTCATAGGAATATTGAGCGAGACACCTTGTGAACTGAAACATCTTAGTAGCAAGAGGAA                  AAGAAAATAAAAATGATTTCTTTAGTAGTGGCGAGCGAACGAGAAAGAGCCCAAACCACTTTAAGTGGGGTTG                  TAGGACGATCTACATAAAGTTACAAAATTTAATAATAGCAGAAGCTTTTGAAAAGGGCGGCATAGAGAGTGAT                  ACCCTCGTAAGCGAAATTTAAATCTTTTGGTCGTATCCTGAGTAGGGCGGGCACGTGAAACCCTGTCTGAA                  TCTGCCGGGACCACCCGGTAAGGCTAAATACTAATCAGACACCGATAGTGAAGTACCGTGAGGGAAAGGTG                  AAAAGAACCCTGAGAGGGGAGTGAAATAGATTCTGAAACCACTTACTTACAATTAGTCAGAGCCCGTTTATGGG                  TGATGGCGTACATCTTGCAGTATGGACCGGCGAGTTACGTTTGCATGCGAGGTTAACCGGATAAAAAGGGGAGCC                  GTAGAGAAATCGAGTCTTAATAGGGCGAATTAGTATGTAGTCTGATACCCGAAACCATGTGATCTATTTCATGAG                  CAGGTTGAAGCTGCGGTAAAACGAGTGGAGGACCGAACCGTAGTACGCTGAAAAGTGCCTGGATGACTTGTGA                  ATAGCGGAGAAATTCGAATCGAACTTGGAGATAGCTGGTTCCTCGAAATAGCTTTAGGGCTAGCGTGTAGTG                  TTAAGTAGTGGTGGTAGAGCACTGAATATGGAATGGCGGCGCCTAGCTGTACTGACTATAATCAAACCTCCGAAT                  ACCACTATGTATTGCTATGCACTCGGAACCGGGGTGCTAACGTCCTGGCTCGCGAGGGCAACAACCCAGATCGT                  CGGCTAAGGTCCCAAAATCATGTTAAGTCAGAAAGGTTGTGAGATTTTATAAACAACCTAGGAAGTTGGCTTAGA                  AGCAGCCACCTTTTAAAGAGTGCCTAATAGCTCACTAGTCAAGAGATCTTGCGCCACCAATGTAACGGGAGTAA                  AACATGATACCGAAGCCACGGGTACGAAAGTACGTTAGAGGAGCGTTCCTAGGGCATTGAAGCCAGACCGTGAG                  GACTGGTGGAGCGTAGGAAGTGAGAATGCCGATAGTAACGATTCGTAGTGAAGTCTACGACGCCTATTG                  GGAAGGTTTCTGGGCAAGGTTTCGTCCACCCAGGGTTAGTCAGGACCTAAGGGCAGGCAGACATGCGTAGTGC                  ATGGACAACAGGTTAATATTCCTGTACTTTCTTTAAATGTGATGGAGTGACGGAGAAGGATAGTCTTACCTCTT                  ATTGGATTGAGGGGCAAGCAGTAACTGGTCAGTGTAGGTAATCCGCACTGTATAACCGGAAGCTGTGATGCAT                  AGGCAACGAATTTAGATGATTTTACGCTTCTAGAAAAGCTTCTAACTTAGTTTAAAGAAACCTGTACCAGAGAA                  CGGACACACGTCCTCCAAAGATGAGTATTCTAAGGCGAGCGAGAAAACCAATGTTAAGGAACCTCTGCAAAATGACC                  CGGTAAGTTCGCAAGAAGGGGCGCCCATAGCAATATGGGCCACAGTAAATATGAGGGGCAACTGTTTATCAAA                  AACACAGCTCTCTGCTAAACCGCAAGGTGATGTATAGGGGGTGAAGCCTGCCAGTGCCTGAGGTTAAGTGG                  TCGGTTAGCTTTTACGCGAAGCGTTGAAATGAAGCCCGGTTGAACGGCGGCTAACTATAACGGTCCCTAAGGTA                  GCGAAATTCCTTGTGCGCTAAATACTGACCTGCACGAAAGGCGCAATGATCTCTCAACTGTCTCAACATTGGAC                  TCGGTGAAATTTAGTCCAGTGAAAACGCTGGGTTCCCGCATCAAGACGAAAAGACCCCATGGAGCTTTACTA                  TAACTTCGATTTGAAATTTGGTCTAACATGTGTAGGATAGGTTGGGAGACTTTGAAGCCAGGACCGTAGTCTGG                  TGGAGTCAACCTTGAAATACCACCTTTTATATTGAGTTTCTAACTTACCATCATTATCAGGTGGGAGGACAG                  TCGGTGGCGGTTAGTTTACTGGGGCGTCCCTCTAAAGAGTAAACGGAGGCGTTCAAAGGTACACTCAATAC                  GGTCAGAAACCGTATGTAGAGCGCAAAGGTAGAAGTGTGCTTACTGTGAGACTTACAAGTCGAGCAGGTGCGA                  AAGCAGGACTTAGTGATCCGGCTGTACATTTGTGGAATGGCAGTCGCTCAACGGATAAAAAGTTACCTGGGGATA                  ACAGGCTTATCTTGCCCAAGA</p>

Tabla 4.10. Secuencia del gen 23S del ARNr de la cepa *Mycoplasma* sp. Jámara-1.

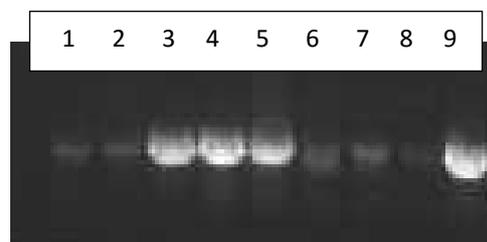
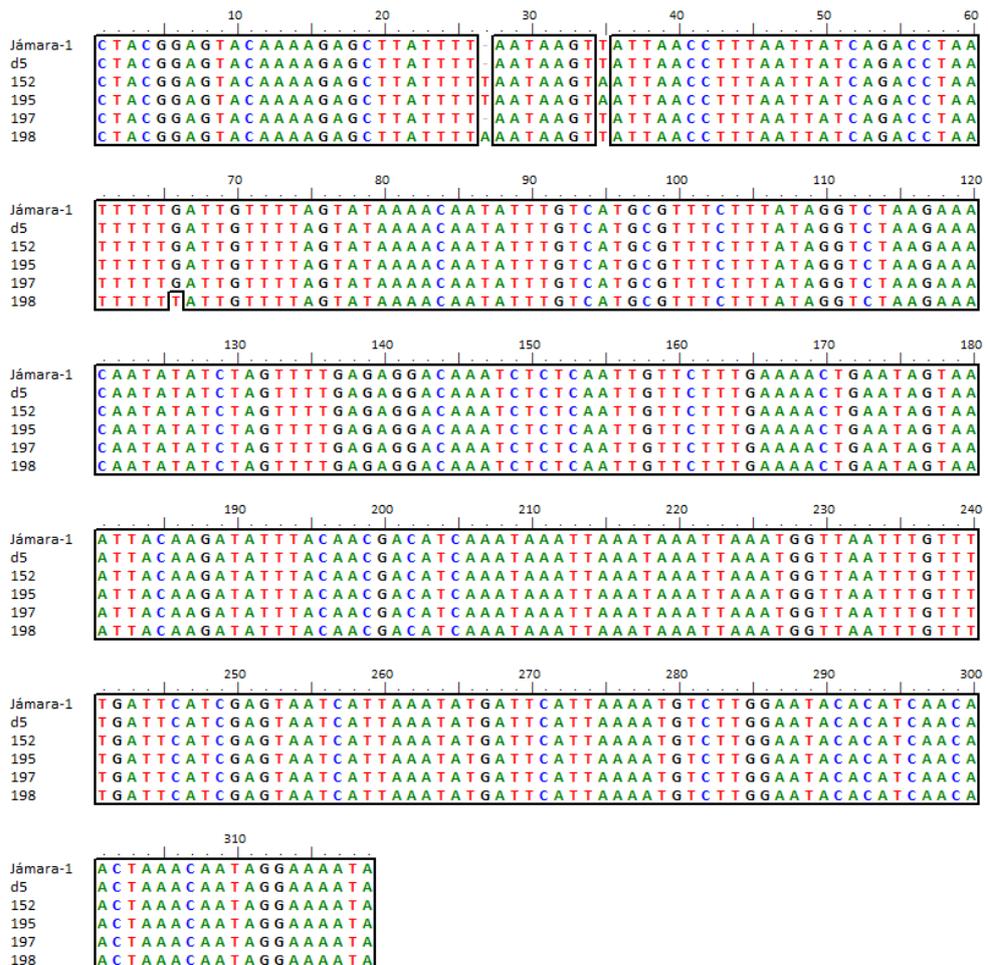


Figura 4.8. Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos de PCR de la ISR. Muestras de derecha a izquierda: ocho muestras de vagina de dromedaria positivas para micoplasmas (muestras 1-8) y *M. sp. Jámara-1* (muestra 9).

Cinco de las 10 muestras positivas en total fueron seleccionadas al azar y se enviaron para su secuenciación de la ISR. El alineamiento de las secuencias se puede ver en la **figura 4.9**. Se puede observar que las secuencias de los diferentes aislamientos son muy similares, presentando una similitud entre el 99 y el 100% con la cepa *M. sp.* Jamara-1 (**tabla 4.11**).



**Figura 4.9.** Detalle del alineamiento de las secuencias de la ISR de cinco de las cepas detectadas en vagina de dromedarias.

	Jámara	D5	152	195	197	198
Jámara	ID	100%	99,3%	99,3%	100%	99,3%
D5	100%	ID	99,3%	99,3%	100%	99,3%
152	99,3%	99,3%	ID	100%	99,3%	99,0%
195	99,3%	99,3%	100%	ID	99,3%	99,0%
197	100%	100%	99,3%	99,3%	ID	99,3%
198	99,3%	99,3%	99,0%	99,0%	99,3%	ID

**Tabla 4.11.** Porcentajes de similitud de la ISR entre las diferentes cepas aisladas de dromedario.

En la tabla 4.12 se ve el número de un resumen del total de muestras trabajadas. La mayoría de las muestras se tomaron de vagina y el medio más utilizado fue el PH con un suplemento del 10% de urea.

Localización	Oído	Boca	Ojo	Vagina
Medio				
PH	5	3	5	7
RPMI	6	2	3	3
UREA				64
SP4-II				3

**Tabla 4.12.** Número de muestras tomadas en función de la localización y medio utilizado.

En cuanto a la información referente a la edad de los animales muestreados, solamente fue recopilada de 17 de las 28 dromedarias analizadas del total del estudio, en diez de los 11 positivos totales. El rango de edad oscilaba entre los 6 y los 20 años de edad. El estado de salud general era bueno y la mayoría de las hembras muestreadas, sobre todo en la segunda fase del estudio, estaban preñadas. No se constató si las hembras preñadas tuvieron algún problema con dicha gestación. En la **tabla 4.13** se puede ver información sobre ello, además de mostrar los resultados de la detección de micoplasmas y sus correspondientes códigos de secuencias.

Fase	Dromedario	Edad (años)	Detección de Micoplasmas	Secuencia ISR
<b>1</b>	Jamara	18	<b>+(2/3*)</b>	Jamara-1
	Sahara 8347	-	-	
	Desconocida	-	-	
	Mancha ojo	-	-	
	Silvia	-	-	
	Male 1	-	-	
	Male 2	-	-	
<b>2</b>	Male 3	-	-	
	1	-	-	
	3	-	-	
	4	-	-	
	5	-	<b>+(1/1)</b>	D5
	X (10)	-	-	
	La coja	6-12	-	
	8609	15-18	<b>+(1/3)</b>	152
	8992-negra	-	-	
	Gorda	12	<b>+(1/1)</b>	198 y 199
	GC 2728-A	-	-	
	Ultima camella	8-9	<b>+(1/1)</b>	195 y 196
	Argolla nariz	18	<b>+(1/1)</b>	197
	8614	12-13	<b>+(1/1)</b>	
	8604	17	<b>+(1/1)</b>	
	Fatima (5720)	20	<b>+(1/1)</b>	
	GC272817	18	<b>+(1/1)</b>	
	Zeluca	6-12	-	
	Antonia	6-12	-	
	Hastigma	6-12	-	
La flaca	6-12	<b>+(1/1)</b>		
Sahara libre	6-12	-		
Sahara no libre	6-12	-		
Crotal verde	6-12	-		

**Tabla 4.13.** Información sobre los dromedarios muestreados: nombre, edad, presencia de micoplasmas y secuencia de la ISR. \*Número de muestreos positivos a micoplasmas sobre el número de muestreos realizados.

#### 4.4. Discusión

El camello es un animal de granja económicamente importante en Oriente Medio y el Norte de África, donde se usa como medio de transporte, en deportes y para obtener carne, leche, pelo y cuero (Elfaki y cols., 2002). Antiguamente se pensaba que los camellos eran resistentes a la mayoría de las enfermedades que comúnmente afectan al ganado, pero datos más recientes confirmaron su susceptibilidad a un gran número de agentes patógenos. Incluso se ha insinuado que son capaces de transmitir varias enfermedades de animales trasfronterizas, tales como la lengua azul, fiebre del Valle del Rift y fiebre del Nilo Occidental (Al-Ruwaili y cols., 2012). Sin embargo, la mayoría de las técnicas de laboratorio usadas en el diagnóstico de enfermedades en camellos no están validadas. Estos atributos han estimulado el estudio de los agentes patógenos que pueden afectar a la salud y productividad de los camellos, así como su papel como reservorios. Por ejemplo, se considera que el dromedario es el reservorio del coronavirus MERS que afectó a países de Oriente Medio (Shapiro y cols., 2016).

Respecto a los mollicutes, se sigue conociendo poco el papel que juegan en la etiología de enfermedades en el camello (Higgins, 1986; Elfaki y cols., 2002), no encontrándose publicaciones recientes del tema. Esta situación también se puede aplicar al estudio de la flora micoplásmica de dromedarios clínicamente sanos, existiendo en la actualidad publicados únicamente dos artículos al respecto. En ellos se han detectado mediante técnicas de biología molecular, spiroplasmas en el intestino anterior (Samsudin y cols., 2011) y anaeroplasmas en el rumen (Gharechahi y cols., 2015).

Se piensa que los micoplasmas tienen un rango de hospedadores estricto, si bien, existen evidencias de la ocurrencia de micoplasmas produciendo enfermedades fuera de sus

hospedadores naturales (Pitcher y Nicholas, 2013; Citti y Blanchard, 2013). Por ejemplo, siempre se creyó que los antílopes (subfamilia hippotraginae) no eran susceptibles a la pleuropneumonía contagiosa caprina, sin embargo, Chaber y cols. (2013) describieron por primera vez un brote de esta enfermedad en órices de Arabia.

En base a la escasa información disponible en la literatura a cerca de aislamientos de micoplasmas en camélidos y dado el elevado censo relativo de dromedarios existente en las Islas Canarias, se consideró este trabajo como una buena oportunidad para avanzar en el conocimiento de la micoplasmología en dromedarios.

Teniendo en cuenta lo complicado del manejo de estos animales, se precisa de una persona entrenada para ello dada la peligrosidad que conlleva, se llevó a cabo una selección de conveniencia de los animales estudiados en base a la docilidad y la facilidad de manejo de dichos animales para el personal que maneja a estos animales diariamente, al fin de evitar situaciones de estrés innecesarios y/o posibles lesiones de los animales o de los trabajadores. Y por esta misma razón y por lo agresivo que suelen ser los dromedarios machos (Schulz, 2008), sólo se tomaron muestras de tres machos y únicamente de la conjuntiva. La mayoría de los dromedarios se muestrearon una única vez, si bien cuatro de ellos fueron muestreados varias veces.

En nuestro trabajo no hemos encontrado evidencias de presencia de micoplasmas del grupo *M. mycoides* ni de *M. agalactiae* en dromedarios. Si bien, como España es un país libre de pleuropneumonía contagiosa bovina y caprina, no se esperaba encontrar a sus agentes causales, Mmm y Mccp, respectivamente (OIE: [www.oie.int](http://www.oie.int)). En un estudio anterior para evaluar las seroprevalencias de Mmc y *M. agalactiae* en ganado caprino, dieron unas prevalencias del 78,8%

y 85%, respectivamente. Y se considera que las enfermedades que producen estos microorganismos son endémicas de las Islas Canarias (Assunção y cols., 2004). Por otro lado, en el servicio de diagnóstico de nuestro grupo de investigación “Epidemiología y Medicina Preventiva” además de aislar habitualmente de cabras Mmc y *M. agalactiae*, se aísla *M. putrefaciens*. Nuestros resultados están en consonancia con los de De la Fe y cols. (2009), dicho trabajo tampoco halló evidencia de infección de Mmc y *M. agalactiae* en dromedarios de Lanzarote. También coincidimos con dichos autores en considerar que los dromedarios, al menos en Canarias, no son un riesgo potencial de transmitir estas micoplasmosis, a pesar del contacto directo o indirecto entre dromedarios y cabras en Canarias. También está de acuerdo con Hung y cols. (1991) que tampoco encontró evidencias serológicas de *M. agalactiae* en camélidos sudamericanos, aunque sus resultados sí sugerían una evidencia de exposición a Mmc.

Sin embargo, sí que se detectaron micoplasmas de especies desconocidas. El mejor medio para la toma de muestras fue el PH suplementado con un 10% de urea. El uso de este medio suplementado con urea se basa en lo sugerido por Tibary y cols. (2006), que recomienda este medio para el examen de ureaplasmas y micoplasmas, además de otras bacterias, en el caso de las muestras uterinas. Sin embargo, para el posterior cultivo el medio empleado con más efectividad, de entre todos los comprobados, fue el SP4-II (Ramírez y cols., 1997), medio que ya ha demostrado su utilidad en el aislamiento de mollicutes. No se aislaron ureaplasmas ni acholeplasmas. A Spersger y cols. (2002), les pasó algo parecido trabajando con equinos. Tampoco consiguieron aislar *Ureaplasmas* del tracto genital. Pero habría que matizar que solamente pudieron cultivar *Mollicutes* con éxito del 36% de las muestras positivas a la PCR. Esta discrepancia podría ser explicada por la presencia de especies de *Ureaplasmas* altamente

exigentes y/o micoplasmas no cultivables (Spergser y cols., 2002). En nuestro estudio se detectaron dos micoplasmas desconocidos, nombrados provisionalmente Jámara-1 y Jámara-2. El primero se detectó en 11 de las 28 vaginas de las dromedarias analizadas y la segunda se detectó en la vagina de Jámara y se cree que también en su oído (una muestra de 28). No se detectaron micoplasmas en ojos, ni en boca. Como de los dromedarios machos únicamente se analizaron los ojos, no se detectaron micoplasmas en machos, si bien el número de muestras analizado fue muy pequeño. Las cepas de Jámara-1 se detectaron en 11 muestras de las 64 muestras recogidas en medio PH con urea (de un total de 77 muestras de vagina), mientras que, de las 11 muestras recogidas de oído, la cepa Jámara-2 se detectó en una de ellas, además de estar en la misma muestra de vagina de Jámara-1. En total, se detectaron micoplasmas en 12 de las muestras analizadas, una de oído y el resto de vagina, mediante el empleo de PCR y secuenciación, identificándose dos posibles nuevas especies de micoplasmas.

En 10 aislamientos de muestras vaginales de la fase dos del estudio se detectaron cepas de micoplasmas cuyas secuencias de las ISR fueron idénticas (99-100%) a las encontradas en la cepa identificada como Jámara-1. Asimismo, se detectó una cepa de micoplasma aislada de la muestra de oído de la dromedaria Jámara cuyo análisis de la secuencia parcial del gen 16S ARNr tras BLAST SEARCH daba el mismo resultado con la secuencia de la ISR de la cepa Jámara-2. En ambos casos se encontró que los micoplasmas con una similitud mayor eran *M. indiense* y *M. orale*. A su vez, estas dos cepas no pudieron ser cultivadas ni en medio PH ni en SP4-II. El fracaso de los subcultivos de estas cepas podría significar que se trata de un tipo de micoplasma altamente exigente. Además, al realizarse la clonación de la cepa Jámara-1 no se observó dimorfismo en las colonias. Si bien se sospecha que ambas cepas podrían ser la misma especie no

hay suficientes evidencias para hacer esta conclusión. Basándonos en estos datos, se cree que se detectaron dos tipos de micoplasmas, aunque sólo fue posible aislar uno de ellos y mantenerlo en el medio de cultivo SP4-II (Jámara-1).

El hecho de que la muestra de oído que dio un resultado positivo con la PCR de van Kuppeveld y cols. (1992), pero no con la PCR de la ISR (Ramírez y cols., 2008a), no tiene fácil explicación. En el trabajo de Vega-Orellana y cols. (trabajo aceptado) se comparan seis PCRs diferentes y dos de ellas son las que se utilizaron en este estudio. En dicho trabajo se demuestra que la PCR de Ramírez y cols. (2008a) es 10 veces más sensible que la de van Kuppeveld y cols. (1992). Por lo que el resultado de la PCR de la ISR, se puede deber a errores en el pipeteo.

En cuanto al perfil bioquímico de la cepa *M. sp.* Jámara-1 solo resultó positiva la hidrólisis de arginina, lo que concuerda con lo descrito para el micoplasma aislado por Elfaki y cols. (2002). Estos autores identificaron los micoplasmas aislados como *M. arginini*, en base a las pruebas bioquímicas y de inhibición de crecimiento, no obstante, las muestras no fueron analizadas por biología molecular como en nuestro caso.

Filogenéticamente, la cepa aislada *M. sp.* Jámara -1 queda incluida dentro del grupo de *M. hominis*, en el grupo *M. bovis* y, más específicamente, en el subgrupo *M. bovis genitalium*, compartiendo con los otros miembros del subgrupo la incapacidad de fermentar la glucosa (Pettersson y cols., 2001; Brown y cols., 2010b). La similitud mayor hallada con esta secuencia fue con *M. sp. Mirounga* ES2805-ORL. Estas especies mostraron a nivel del gen que codifica el ARNr 16S una similitud del 97%, mientras que las similitudes con los otros micoplasmas fueron inferiores al 96%. Basándose en esa información y la aplicación de la premisa de Pettersson y

cols. (2001), *M. sp.* Jámara-1 y *M. sp.* Mirounga ES2805-ORL podrían definirse como constitutivas de otra línea de descendencia, por separado del subgrupo *M. bovigenitalium*.

La estructura de los ribosomas es muy conservativa. En procariotas la subunidad 50S contiene un ARNr 23S y otro de 5S y más de 30 proteínas, mientras que la subunidad 30S contiene el ARNr 16S más 20 proteínas. Como se necesita una relación espacial precisa para el ensamblado de los ribosomas, esto ha hecho que los genes ARN ribosomales hayan evitado cambios drásticos. Sin embargo, las regiones intergénicas del operón ARN han mutado en una tasa mayor. Esto hace que las regiones conservativas son útiles para determinar relaciones distantes, mientras que las ISR son más útiles para distinguir entre organismos con relación cercana (Pei y cols., 2009)

El análisis de la secuencia del gen 23S ARNr de la cepa Jámara-1 dio como resultado con los micoplasmas más cercanos un 94% con *M. fermentans* y 93% con *M. californicum*, *M. bovigenitalium*, *M. bovis* y *M. agalactiae*, siendo estos micoplasmas los únicos del grupo *M. bovis* (Grupo *Hominis*) con las secuencias del gen 23S ARNr publicadas. Los árboles filogenéticos basados en los genes 16S y 23S ARNr son equivalentes, en general. En el pasado el gen 16S ARNr ganó el favor de los científicos y es el que más ha sido utilizado, aunque recientemente se ha renovado el interés por el uso del gen 23S ARNr. El límite de variación admitido dentro de una misma especie tanto en el gen 16S como en el 23S ARNr es del 3% (Pei y cols., 2009). Por lo que el análisis del gen 23S ARNr también confirma que esta cepa de micoplasmas es una nueva especie.

La mayoría de los micoplasmas tienen variabilidad intraespecífica en el ISR que va desde el 0% (*M. iowae*, *M. pulmonis*, *M. pneumoniae*) hasta el 6% (*M. gallisepticum*) (Volokhov y cols., 2006; Ramírez y cols., 2008a), en nuestro estudio la variabilidad oscilaba entre los valores 0-1% para los diferentes aislamientos de *M. sp.* Jámara-1. Volokhov y cols. (2006) analizó la misma región de la mayoría de los micoplasmas encontrando que micoplasmas incluidos en el subgrupo *M. bovigenitalium* (clúster *M. bovis*) podrían tener un porcentaje de similitud tan alto como 92,4% para *M. californicum* y *M. simbae*. Sin embargo, este porcentaje se reduce al 87% cuando se compara únicamente las secuencias de la ISR, sin nucleótidos de los genes ARNr 16S y 23S. La secuencia de la ISR de *M. sp.* Jámara-2 dio un porcentaje de similitud del 91% con *M. orale* y del 90% con *M. indiense*. Ambas especies están incluidas dentro del grupo *M. hominis* y el porcentaje de similitud de la ISR entre *M. orale* y *M. indiense* es del 95,3% (Volokhov y cols., 2006), aunque analizando estrictamente las secuencias de la ISR este porcentaje baja al 92%. Sin embargo, al comparar las cepas *M. sp.* Jámara-1 y -2 el porcentaje de similitud del 48,9%. Toda esta información sugiere que estos micoplasmas constituyen, posiblemente, dos nuevas y desconocidas especies.

En relación con la edad, ocho animales que dieron positivo a micoplasmas tenían una edad igual o superior a los 12 años, mientras que dos eran adultas más jóvenes. Aunque el resultado no es significativo, se puede deducir que es más probable detectar micoplasmas en animales adultos que en hembras más jóvenes. Spergser y cols. (2002) publicaron resultados similares cuando estudiaron la prevalencia de micoplasmas en el tracto genital de los sementales. Sin embargo, en contraposición encontramos un estudio epidemiológico transversal, que investigó la presencia de infección por Candidatus *M. haemolamae* en alpaca (*Vicugna pacos*),

donde la tasa más alta de infección se daba en aquellos animales más jóvenes (< 2 años), en comparación con los animales de más edad (Crosse y cols., 2012).

Los dromedarios pueden alcanzar hasta los 40 años de edad. Observando su aspecto general y con un poco de experiencia, se sabrá a qué grupo de edad pertenece uno de ellos. Cada región tiene su propio criterio de clasificación y éste va a depender de la aptitud del animal, el desgaste, los cuidados y la raza. En Canarias se consideran que son güelfos a las crías lactantes (hasta 6-9 meses), Majalulo a los animales destetados en pleno crecimiento. Los camellos a partir de los cuatro años ya son considerados camellos jóvenes, mientras que para ser considerados adultos tienen que tener al menos 6-7 años. De 15 a 18 años, son camellos de edad avanzada. Y por último los camellos viejos son los mayores de 18-20 años (Schulz, 2008).

La tasa reproductiva de los dromedarios es muy baja, principalmente debido a una gestación prolongada, un alto porcentaje de muerte embrionaria temprana y que los güelfos recién nacidos son muy delicados (Schulz, 2008). La única señal de que una hembra está vacía es que deja de levantar el rabo y de agitar lateralmente su punta, cuando se acerca un macho, que es el signo de que están preñadas. Éste fue el método de diagnóstico de preñez utilizado en nuestro estudio. Cuando el ganadero conoce bien a sus camellas y ante la presencia de un macho es un método de diagnóstico bastante fiable (Schulz, 2008).

Varias especies de *Mollicutes* pueden producir infertilidad en mamíferos, tales como en el ganado caprino, equino y actuar como patógenos humanos, siendo el caso de *M. agalactiae*, *M. equigenitalium*, *M. subdolum*, *M. hominis*, *M. genitalium*, o *Ureaplasma* spp., los cuales además han sido detectado en animales asintomáticos (Spergser y cols., 2002; Gdoura y cols., 2007; De la

Fe y cols., 2009a.). Específicamente, *M. equigenitalium* y *M. subdolum* fueron aislados del tracto genital de las yeguas y de fetos equinos abortados; sin embargo, la aparición de micoplasmas no pudo ser correlacionada con la reducción de la fertilidad (Spergser y cols., 2002). La eficiencia reproductiva de dromedarios se considera baja y se sabe que existe relación entre esta y organismos infecciosos, siendo las infecciones uterinas, la causa más común de insuficiencia reproductiva en camélidos (Tibary y cols., 2006). Sin embargo, los aislamientos de micoplasmas no mostraron estar asociados con trastornos reproductivos, cualquier enfermedad o síntoma clínico en este estudio.

Nuestro trabajo ha aportado información sobre la presencia de micoplasmas en dromedarios en Canarias. Afortunadamente, parece que no están relacionados con problemas reproductivos. Teniendo en cuenta que desde que se prohibió la importación de dromedarios del Norte de África, hasta entonces la única vía de conseguir sangre nueva para la población camellar canaria, es muy importante conservar el ganado mediante un buen programa de reproducción y de medicina preventiva (Schulz, 2008). No obstante, un trabajo reciente de Al-Busadah y cols. (2017) ha detectado *Mycoplasma* spp. como el agente más predominante en semen de dromedarios infértiles, considerando que pueden estar asociados con dicha patología. En este trabajo se sugiere que sería interesante aislar los micoplasmas para poder identificar las especies y ver si se trata de los mismos micoplasmas que los descritos en nuestro trabajo publicado con el título “Mycoplasma detection and isolation from one-humped camels (*Camelus dromedarius*)” (Mederos-Iriarte y cols., 2014).

Basándose en los resultados, se puede concluir que estos micoplasmas aislados de dromedarias aparentemente sanas, *M. sp. Jámara-1* y *M. sp. Jámara-2*, podrían ser nuevas especies. Sin embargo, hace falta más trabajo para poder describir a *M. sp. Jámara-1* como una nueva especie. La identificación de nuevos micoplasmas da un valor extra a los resultados y proporciona información para el ecosistema bacteriano escasamente investigado de los camélidos.



## **Conclusiones**

---



**Conclusiones:**

**- Primera:**

El uso de regiones conservadas tales como el gen ARNr 23S para el análisis filogenético del grupo *Mycoplasma mycoides* y especies relacionadas se recomienda frente al uso de las regiones intergénicas 16S-23S y 23S-5S.

**- Segunda:**

La región entre los genes 16S y 23S del ARN ribosomal aplicada a la técnica PCR/DGGE para el diagnóstico de especies del grupo *Mycoplasma mycoides* y especies relacionadas representa una alternativa más discriminativa que el gen 16S ARNr.

**- Tercera:**

El incremento de resistencia a eritromicina en los mutantes seleccionados *in vitro* se asoció a las transiciones en los nucleótidos 2080 en las cepas resistentes derivadas de *Mycoplasma mycoides* subespecie *mycoides* T1/44, coincidiendo con resistencias descritas para otros micoplasmas como *Mycoplasma pneumoniae*. Y en los nucleótidos 327, 1927, 2032 y 2633 en las cepas Abomsa y C1-95043 de *Mycoplasma capricolum* subespecie *capripneumoniae*, no descritas con anterioridad.

**- Cuarta:**

De los antibióticos ensayados frente a cepas de referencia del grupo *Mycoplasma mycoides* y de otras especies relacionadas filogenéticamente con ellos, la tilmicosina fue

## Conclusiones

---

el más efectivo seguido de espiramicina y lincomicina. Sin detectarse resistencia a los antibióticos ensayados en ninguno de los casos.

### - Quinta:

Los extractos de *Artemisia vulgaris* L. fueron efectivos inhibiendo el crecimiento de cepas de referencia de micoplasmas de las especies *Mycoplasma mycoides* subespecie *capri* y *Mycoplasma capricolum* subespecie *capricolum* del grupo *Mycoplasma mycoides* y *Mycoplasma cottewii* y *Mycoplasma yeatsii*, a concentraciones que se han demostrado terapéuticamente útiles en casos de infecciones parasitarias en animales de granja y de compañía.

### - Sexta:

Los dromedarios no son un riesgo potencial en la transmisión de micoplasmosis caprinas endémicas en Gran Canaria, a pesar del contacto directo o indirecto entre dromedarios y cabras en esta isla.

### - Séptima:

*Mycoplasma* spp. Jámara-1 y Jámara-2 podrían representar nuevas especies de micoplasmas, basados en los datos expuestos en esta tesis. Sin embargo, hace falta más trabajo de caracterización para poder describir oficialmente dichos aislamientos como nuevas especies.

**Resumen**

---



Dentro de los micoplasmas que afectan a los rumiantes domésticos cabe destacar los incluidos dentro del grupo *M. mycoides*, por su patogenicidad. Actualmente el grupo mycoides está formado por cinco micoplasmas: *Mycoplasma (M.) mycoides* subsp. *mycoides* (Mmm), *M. mycoides* subsp. *capri* (Mmc), *M. capricolum* subsp. *capricolum* (Mcc), *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* (Mccp) y *M. leachii* (Mleach). Dentro de los cuales nos encontramos con el agente causal de la perineumonía contagiosa bovina (Mmm) y el de la pleuroneumonía contagiosa caprina (Mccp). También tenemos a Mmc y Mcc que junto a *M. agalactiae* y *M. putrefaciens* son los responsables de la agalaxia contagiosa caprina. La importancia de estas enfermedades se refleja en que se encuentran en la lista de la OIE, mientras que *M. leachii* produce graves problemas de producción en ganado vacuno.

Estos micoplasmas requieren de condiciones de laboratorio especiales, incluyendo la utilización de medios de cultivo complejos, por su limitada capacidad de biosíntesis. Esto dificulta a su vez su identificación fenotípica, mientras que las pruebas serológicas tienen el inconveniente de presentar reacciones cruzadas. Por ello las técnicas de elección para la detección e identificación de los micoplasmas de este grupo son las de biología molecular, especialmente la PCR. Debido a que la región 16S por sí sola no basta para poder diferenciar a los componentes del grupo *M. mycoides* se hace necesario estudiar otras regiones del genoma.

Por ello se decidió analizar la región que codifica el gen del ARNr 23S, ya que es una herramienta útil como marcador filogenético en las relaciones evolutivas entre las especies de micoplasma, a la vez que se analizaron también las regiones intergénicas entre los genes 16S-23S y 23S-5S ARNr.

## Conclusiones

---

Se trabajó con las cinco cepas tipo de los componentes del grupo mycoides; Mmm, Mmc, Mcc, Mccp y Mleach. Además, se trabajó con otra cepa de Mmc, la anteriormente conocida como *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC y tres especies más de micoplasmas relacionados con el grupo *M. mycoides*, pero no pertenecientes al él: *M. putrefaciens* (Mptr), *M. cottewii* (Mcot) y *M. yeatsii* (Myeat).

Las secuencias del gen 23S ARNr resultaron no ser más discriminativas que las secuencias del gen 16S ARNr para poder servir de base para el diseño de cebadores específicos que puedan ser utilizados en el diagnóstico de las micoplasmosis producidas por micoplasmas del grupo *M. mycoides*. Lo mismo ocurre con las regiones intergénicas. Si bien, los árboles filogenéticos obtenidos de estas tres dianas producen un árbol muy parecido al obtenido con las secuencias del gen 16S ARNr. Otra prueba complementaria realizada fue la DGGE (Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante) con los productos de PCR de la región intergénica entre 16S y 23S, dando resultados similares a los obtenidos con el gen ARNr 16S, por lo que puede ser usado como alternativa o complementaria al análisis de este gen por DGGE.

Referente a la parte experimental correspondiente a la resistencia a antibióticos y búsqueda de mutaciones puntuales, los micoplasmas utilizados fueron Mmm y Mccp, cuyas cepas se trabajaron en el CIRAD (cepa virulenta 8740-Rita y cepa vacunal T1/44/2K de Mmm y 9231- Abomsa y 95043-C1 de Mccp). Se consiguieron mutantes espontáneos frente a la eritromicina en todas las cepas. Se secuenciaron los genes 23S en busca de mutaciones puntuales que pudieran explicar dicha resistencia. A pesar de encontrarse mutaciones en dicho gen, no se encontró un patrón general entre todas las cepas trabajadas.

En cuanto a las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) se realizó con los siguientes antibióticos macrólidos: tilmicosina, lincomisina y la espiramicina. La espiramicina presentó las concentraciones más bajas necesarias para inhibir el crecimiento de las especies Mmc (0,06 µg/ml), Mmm (0,03 µg/ml) y Mcot (0,06 µg/ml) y la tilmicosina en el caso de Mleach (0,06 µg/ml), Mptr (0,03 µg/ml). Myeat (0,06 µg/ml) mostró el mismo valor para ambos antibióticos. La lincomisina (0,5-0,25 µg/ml) mostró los mayores valores para todas las especies de micoplasmas. Estos resultados se compararon con los obtenidos en un estudio paralelo donde se calculó las CMI del extracto acetónico de artemisa (*Artemisia vulgaris*), dando unas CMIs entre 12,5 y 25 mg/ml.

Por otra parte, debido a que muchas especies de ungulados actúan como reservorio natural de los micoplasmas, se decidió llevar a cabo un muestreo en dromedarios en el sur de la isla de Gran Canaria, para estudiar el posible papel de los dromedarios como reservorios de micoplasmas del grupo *M. mycoides*. No se evidenció la presencia de ninguno de esos micoplasmas, aunque sí se detectaron dos especies de micoplasmas desconocidas, de las cuales solo se pudo aislar una de ellas, demostrándose que se trata de una nueva especie de *Mycoplasma*.



## Summary

---



Mycoplasmas belonging to the cluster *M. mycoides* are considered some of the most relevant mycoplasmas affecting domestic ruminant species. Five mycoplasmas are included in the cluster mycoides: *Mycoplasma (M.) mycoides* subsp. *mycoides* (Mmm), *M. mycoides* subsp. *capri* (Mmc), *M. capricolum* subsp. *capricolum* (Mcc), *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* (Mccp) y *M. leachii* (Mleach). This cluster includes two of the most important bacterial diseases in ruminants: Contagious bovine pleuropneumonia (CBPP), caused by Mmm, and contagious caprine pleuropneumonia (CCPP), caused by Mccp. In addition, Mmc and Mcc, together with *M. agalactiae* and *M. putrefaciens*, are the etiological agents of contagious agalactia of sheep and goat. All these diseases are OIE listed, hence their importance in animal health worldwide. In addition, *M. leachii* causes important economic losses for cattle industry worldwide.

Mycoplasmas in general require special laboratory conditions for their culture and isolation in vitro, due to their limited ability to synthesise some nutrients. This fact makes phenotypic characterisation of mycoplasma extremely complicated, while other tests, such as serological techniques have the disadvantage of cross-reactivity between different species. Based on these evidence, molecular-based tests are the techniques of choice for the detection and identification of mycoplasmas, particularly PCR-based techniques. Because the 16S rRNA gene, a universal target for bacterial molecular identification, has not enough discriminatory power to differentiate between mycoplasmas belonging to the cluster *M. mycoides*, its needed to study other regions in the genome of these mycoplasmas to obtain better diagnostic tools.

Based on that we decided to analyse the region codifying for the 23S rRNA gene of these mycoplasmas, a region that been demonstrated as a useful target for the analysis of phylogenetic

## Summary

---

relationship and evolution of mycoplasma, together with two other regions, the intergenic spacer region (ISR) 16S-23S and the ISR 23S-5S.

In this thesis, we worked with the five mycoplasma species belonging to the cluster *M. mycoides*. In addition, we worked with another strain of Mmc, representing the specie previously known as *M. mycoides* subsp. *mycoides* LC (Y goat strain), plus three other mycoplasma species closely related to the cluster *M. mycoides*: *M. putrefaciens* (Mptr), *M. cottewii* (Mcot) y *M. yeatsii* (Myeat).

The analysis of the sequences obtained from the 23S rRNA gene were not found to be more discriminative than those from the 16S rRNA gene for their potential use as targets for developing cluster *M. mycoides*-specific PCR diagnostic primers. The same characteristics were found when analysing the 16S-23S and 23S-5S ISRs. However, the phylogenetic trees inferred from the sequences obtained from all the target genes were highly similar to those observed when using 16S rRNA cluster *M. mycoides* sequences. A complementary diagnostic test, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was performed using the 16S-23S ISR, giving similar discriminatory power to that observed when using 16S rRNA specific primers, subsequently it can be used as alternative to 16S rRNA-based DGGE or as a combined test with 16S rRNA DGGE.

Mmm and Mccp were used for the evaluation of antimicrobial resistance and for the search of point mutations in the 23S rRNA gene. Mmm vaccine strain T1/44/2k, Mmm virulent strain 9231-Abomsa and Mccp strain 95043-C1 were used for the study, performed at CIRAD (France). Spontaneous mutant isolates against erythromycin were found for all mycoplasmas

tested. 23S rRNA gene was sequenced in the search for mutations that could explain the presence of those resistant isolates. Nevertheless, no specific pattern of mutations that could explain the resistance to erythromycin could be found.

The study of the minimum inhibitory concentration (MIC) was performed against the following macrolides: tilcomisin, lincomysin and spiramycin. Spiramycin showed the lowest inhibitory concentrations: Mmc (0,06 µg/ml), Mmm (0,03 µg/ml) and Mcot (0,06 µg/ml). For tilmicosin, Mleach (0,06 µg/ml) and Mptr (0,03 µg/ml) showed the lowest MIC. Myeat (0,06 µg/ml) showed the same MIC value for tilcomisin and spiramycin. Lincomysin showed the highest MIC values for all the mycoplasma species tested (0,5-0,25 µg/ml). These results were compared to those obtained in a study carried in parallel where ketonic extract from mugwort (*Artemisia vulgaris*), where a CMI ranging from 12,5 to 25 mg/ml were observed.

In addition, since many ungulate species act as natural mycoplasma reservoirs, we decided to carry out a survey to study the role of dromedaries as reservoirs of mycoplasmas belonging to the *M. mycoides* cluster in the south of Gran Canaria. No cluster *M. mycoides* or related mycoplasmas were found in the dromedaries tested. However, two not previously described mycoplasmas species were detected, from which only one could be isolated in pure culture, subsequently being demonstrated as new bacterial specie belonging to the genus *Mycoplasma*.



## **Bibliografía**

---



## Bibliografía

**Abu-Groun EA, Taylor RR, Varsani H, Wadher BJ, Leach RH, Miles RJ. (1994).** Biochemical diversity within the "*Mycoplasma mycoides*" cluster. *Microbiology*. 140, 2033-2042.

**Adler HE, DaMassa AJ, Brooks DL. (1980).** Caprine mycoplasmosis: *Mycoplasma putrefaciens*, a new cause of mastitis in goats. *American Journal of Veterinary Research*. 41(10), 1677-9.

**Ahad S, Tanveer S, Nawchoo IA, Malik TA. (2017).** Anticoccidial activity of *Artemisia vestita* (*Anthemideae, Asteraceae*) - a traditional herb growing in the Western Himalayas, Kashmir, India. *Microbial Pathogenesis*. 104:289-295.

**Al-Busadah KA, El-Bahr SM, Khalafalla AI. (2017).** Serum biochemical profile and molecular detection of pathogens in semen of infertile male dromedary camels (*Camelus dromedarius*). *Animal Reproduction Science*. 180, 58-65.

**Allix-Béguec C, Harmsen D, Weniger T, Supply P, Niemann, S. (2008).** Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTR plus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 46(8), 2692-2699.

**Almagor M, Kahane I, Yatziv S. (1984).** Role of superoxide anion in host cell injury induced by *Mycoplasma pneumoniae* infection. A study in normal and trisomy 21 cells. *The Journal of Clinical Investigation*. 73(3), 842-847.

**Almagor M, Kahane I, Wiesel JM, Yatziv S. (1985).** Human ciliated epithelial cells from nasal polyps as an experimental model for *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Infection and Immunity*. 48(2), 552-555.

**Almagor M, Kahane I, Gilon C, Yatziv S. (1986).** Protective effects of the glutathione redox cycle and vitamin E on cultured fibroblasts infected by *Mycoplasma pneumoniae*. *Infection and Immunity*. 52(1), 240-244.

## Bibliografía

---

**Al-Momani W, Abu-Basha E, Janakat S, Nicholas RA, Ayling RD. (2007).** In vitro antimycoplasmal activity of six Jordanian medicinal plants against three *Mycoplasma* species. *Tropical Animal Health Production*, 39(7),515-9.

**Al-Ruwaili MA, Khalil OM, Selim SA. (2012).** Viral and bacterial infections associated with camel (*Camelus dromedarius*) calf diarrhea in North Province, Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 19(1), 35-41.

**Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. (1990).** Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. Vol. 215 (3), Pages 403-410.

**Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25(17), 3389-3402.

**Aluotto B, Wittler R, Williams C, Faber J. (1970).** Standardized bacteriologic techniques for the characterization of *Mycoplasma species*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 20, 35-58.

**Amils R, Ramírez L, Sanz JL, Marín I, Pisabarro AG, Ureña D. (1989).** The use of functional analysis of the ribosome as a tool to determine archaeobacterial phylogeny. *Canadian Journal of Microbiology*. 35(1), 141-7.

**Amsterdam D. (2005).** Susceptibility Testing of Antimicrobials in Liquid Media. Chapter 3. In: Lorian V (Ed.). *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Williams & Wilkins, pp. 61-143.

**Antunes NT. (2007).** Mecanismo de resistencia a las quinolonas en *Mycoplasma mycoides* subsp *mycoides* LC. Tesis Doctoral, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. España.

**Antunes NT, Tavío MM, Mercier P, Ayling RD, Al-Momani W, Assunção P, Rosales RS, Poveda JB. (2007).** *In vitro* susceptibilities of *Mycoplasma putrefaciens* field isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 51(9), 3452-4.

**Antunes NT, Assunção P, Poveda JB, Tavío MM. (2015).** Mechanisms involved in quinolone resistance in *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. *Veterinary Journal*, 204(3), 327-32.

**Atalaia V, Brandão E, Machado M. (1986).** Patologia dos pequenos ruminantes: Agalaxia contagiosa em Portugal. Repositorio de Trabalhos do LNIV. 18, 11-20.

**Archibald R. (1944).** Determination of citrulline and allantoin and demonstration of citrulline in blood plasma. Journal of Biological Chemistry. 156, 121-142.

**Assunção P, De la Fe C, Ramírez AS, Andrada M, Poveda JB. (2004).** Serological study of contagious agalactia in herds of goats in the Canary Islands. The Veterinary Record. 154(22), 684-687.

**Awan MA, Abbas F, Yasinzi M, Nicholas RA, Babar S, Ayling RD, Attique MA, Ahmed Z, Wadood A, Khan FA. (2010).** First report on the molecular prevalence of *Mycoplasma capricolum* subspecies *capripneumoniae* (Mccp) in goats the cause of contagious caprine pleuropneumonia (CCPP) in Balochistan province of Pakistan. Molecular Biology Reports. 37(7), 3401-3406.

**Ayling RD, Bisgaard-Frantzen S, March JB, Godinho K, Nicholas RA. (2005).** Assessing the *in vitro* effectiveness of antimicrobials against *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small-colony type to reduce contagious bovine pleuropneumonia infection. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 49(12), 5162-5165.

**Baczynska A, Svenstrup H, Fedder J, Birkelund S, Christiansen G. (2004).** Development of real-time PCR for detection of *Mycoplasma hominis*. BMC Microbiology. 4, 35-48.

**Balish MF. (2006).** Subcellular structures of *Mycoplasmas*. Frontiers in Bioscience. 11, 2017-2027.

**Balish MF and Krause DC. (2006).** *Mycoplasmas*: a distinct cytoskeleton for wall-less bacteria. Journal Molecular Microbiology and Biotechnology. 11, 244-255.

**Bani-Ismail Z, Al-Rukibat R, Al-Tarazi Y, Al-Zghoul MB. (2007).** Synovial fluid analysis and bacterial findings in arthritic joints of juvenile male camel (*Camelus dromedarius*) calves. Journal of Veterinary Medicine series a-Physiology Pathology Clinical Medicine. 54, 66-69.

**Barile M, Schimke R. (1963).** A rapid chemical method for detecting PPLO contamination of tissue cell cultures. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 114(3), 676-679.

## Bibliografía

---

**Barile M, Schimke R, Riggs D. (1966).** Presence of the arginine dihydrolase pathway in *Mycoplasma*. Journal of Bacteriology. 91(1), 189-192.

**Barile M. (1983).** Arginine Hydrolysis. In: Razin S y Tully J (Eds.). Methods in Mycoplasmology, Vol. I. New York: Academic Press, pp. 345-349.

**Bartlett J, Stirling D. (2003).** A Short History of the Polymerase Chain Reaction. In: Bartlett J y Stirling D (Eds.). Methods in Molecular Biology: PCR Protocols, Vol. 226. Totowa: Humana Press, pp. 3-6.

**Barry T, Collieran G, Glennon M, Dunican LK, Gannon F. (1991).** The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. PCR Methods and Applications. 1(2), 51-56.

**Bascuñana CR, Mattsson JG, Bölske G, Johansson KE. (1994).** Characterization of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma* sp. strain F38 and development of an identification system based on PCR. Journal of Bacteriology. May;176(9):2577-86.

**Baseman JB, Tully JG. (1997).** *Mycoplasmas*: sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety. Emerging Infectious Diseases. 3(1), 21-32.

**Bashiruddin JB, Nicholas RA, Santini FG, Ready RA, Woodward MJ, Taylor TK. (1994).** Use of the polymerase chain reaction to detect mycoplasma DNA in cattle with contagious bovine pleuropneumonia. Veterinary Record. 134(10), 240-241.

**Bébéar C. (1996).** Introductory remarks. In: Tully J y Razin S (Eds.). Molecular diagnostic procedures in mycoplasmology, Vol II. Inc. San Diego: Academic Press, pp. 181-183.

**Bébéar CM, Pereyre S. (2005).** Mechanisms of drug resistance in *Mycoplasma pneumoniae*. Current Drug Targets - Infectious Disorders. 5(3), 263-271.

**Bergonier D, Berthelot X, Poumarat F. (1997).** Contagious agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. Revue Scientifique et Technique. 16(3), 848-873.

**Bertin C, Pau-Roblot C, Courtois J, Manso-Silván L, Tardy F, Poumarat F, Citti C, Sirand-Pugnet P, Gaurivaud P, Thiaucourt F. (2015).** Highly dynamic genomic loci drive the synthesis of two types of capsular or secreted polysaccharides within the *Mycoplasma mycoides* cluster. *Applied and Environmental Microbiology*. 81(2), 676-687.

**Biau A. (1997).** Utilidad de la PCR en el diagnóstico microbiológico rutinario de las patologías infecciosas más frecuentes. Tesis Doctoral, Universidad de Lleida. España.

**Bilofsky HS, Burks C. (1988).** The GenBank genetic sequence data bank. *Nucleic Acids Research*. 16, 1861-1864.

**Bischof DF, Janis C, Vilei EM, Bertoni G, Frey J. (2008).** Cytotoxicity of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type to bovine epithelial cells. *Infection and Immunity*. 76(1), 263-269.

**Black F. (1973).** Phosphatase Activity in T-*Mycoplasmas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 23, 65-66.

**Boatman ES, Kenny GE. (1971).** Morphology and ultrastructure of *Mycoplasma pneumoniae* spherules. *Journal of Bacteriology*. 106(3), 1005-1015.

**Bradbury JM. (1977).** Rapid biochemical tests for characterization of the *Mycoplasmatales*. *Journal of Clinical Microbiology*. 5, 531-534.

**Bradbury JM. (1983).** Phosphatase activity. In: Razin S y Tully J (Eds.). *Methods in Mycoplasmaology*, Vol. I. New York: Academic Press, pp. 363-366.

**Bredt W, Höfling K, Heunert H, Milthaler B. (1970).** Measurements on motile cells of *Mycoplasma pneumoniae*. *Zeitschrift für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie*. 156(1), 39-43.

**Bredt W, Radestock U. (1977).** Gliding motility of *Mycoplasma pulmonis*. *Journal of Bacteriology*. 130(2), 937-938.

## Bibliografía

---

**Briones C, Koroutchev K, Amils R. (1998).** Functional phylogeny: the use of the sensitivity of ribosomes to protein synthesis inhibitors as a tool to study the evolution of organisms. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*. 28(4-6), 571-82.

**Brosius J, Dull TJ, Noller HF. (1980).** Complete nucleotide sequence of a 23S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 77(1), 201-204.

**Brown DR, Zacher LA, Farmerie WG. (2004).** Spreading factors of *Mycoplasma alligatoris*, a flesh-eating mycoplasma. *Journal of Bacteriology*. 186(12), 3922-3927.

**Brown DR, Whitcomb RF, Bradbury JM. (2007).** Revised minimal standards for description of new species of the class Mollicutes (division Tenericutes). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57:2703-2719.

**Brown DR, May M, Bradbury JM, Balish MF, Calcutt MJ, Glas JI, Tasker S, Messick JB, Johansson KE, Neimark H. (2010a).** Genus *Mycoplasma*. In: Krieg N, Staley J, Brown D, Hedlund B, Paster B, Ward N, Ludwig W y Whitman W (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. IV. New York: Springer, pp. 575-613.

**Brown DR, May M, Bradbury JM, Johansson KE. (2010b).** *Mollicutes* class. In: Krieg N, Staley J, Brown D, Hedlund B, Paster B, Ward N, Ludwig W y Whitman W (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. IV. New York: Springer, pp. 568-573.

**Brown D, May M, Bradbury J, Balish M, Calcutt M, Glass J, Tasker S, Messick JB, Johansson KE, Neimark H. (2010c).** Genus I. *Mycoplasma nowak* 1929, 1349 nom. cons. Jud. comm. opin. 22, 1958, 166. In: Krieg N, Staley J, Brown D, Hedlund B, Paster B, Ward N, Ludwig W y Whitman W (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. IV. New York: Springer, pp. 575-613.

**Cazanave C, Charron A, Reanudín H, Bébéar C. (2012).** Method comparison for molecular typing of French and Tunisian *Mycoplasma genitalium*-positive specimens. *Journal of Medical Microbiology*. 61(4), 500-506.

**Chaber AL, Lignereux L, Al Qassimi M, Saegerman C, Manso-Silvan L, Dupuy V, Thiaucourt F. (2014).** Fatal transmission of contagious caprine pleuropneumonia to an Arabian oryx (*Oryx leucoryx*). *Veterinary Microbiology*. 173(1), 156-159.

**Chalker VJ, Brownlie J. (2004).** Taxonomy of the canine *Mollicutes* by 16S rRNA gene and 16S/23S rRNA intergenic spacer region sequence comparison. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54, 537-542.

**Chalker VJ, Owen WM, Paterson CJ, Brownlie J. (2004).** Development of a polymerase chain reaction for the detection of *Mycoplasma felis* in domestic cats. *Veterinary Microbiology*. 100, 77-82.

**Chalker V. (2005).** Canine Mycoplasmas. *Research in Veterinary Science*. 79, 1-8.

**Chan M, Maiden M, Spratt B. (2001).** Database-driven multi locus sequence typing (MLST) of bacterial pathogens. *Bioinformatics*. 17(11), 1077-1083.

**Cheng X, Nicolet J, Poumarat F, Regalla J, Thiaucourt F, Frey J. (1995).** Insertion element IS1296 in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony identifies a European clonal line distinct from African and Australian strains. *Microbiology*. 141, 3221-3228.

**Cherry J, Ley D, Altizer S. (2006).** Genotypic analyses of *Mycoplasma gallisepticum* isolates from songbirds by random amplification of polymorphic DNA and amplified-fragment length polymorphism. *Journal of Wildlife Diseases*. 42(2), 421-428.

**Cirillo V, Razin S. (1973).** Distribution of a phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system in *mycoplasmas*. *Journal of Bacteriology*. 113(1), 212-217.

**Citti C, Blanchard A. (2013).** Mycoplasmas and their host: emerging and re-emerging minimal pathogens. *Trends in Microbiology*, 21(4), 196-203.

**Citti C, Nouvel L, Baranowski E. (2010).** Phase and antigenic variation in *Mycoplasmas*. *Future Microbiology*. 5(7), 1073-1085.

## Bibliografía

---

**Connole MD, Laws L, Hart RK. (1967).** Mastitis in cattle caused by a *Mycoplasma* sp. Australian Veterinary Journal. 43, 157-162.

**Corrales JC, Esnal A, De la Fe C, Sánchez A, Assunção P, Poveda JB, Contreras A. (2007).** Contagious agalactia in small ruminants. Small Ruminant Research, 68:154–166.

**Costilow RN. (1980).** Biophysical factors in growth. In: Gerhardt P, Murray RGE, Costilow RN, Nester EW, Wood WA, Krieg NR y Phillips GB (Eds.). Manual of methods for general bacteriology. Washington, DC: American Society for Microbiology, pp. 66-78.

**Cottew GS, Breard A, DaMassa AJ, Ernø H, Leach RH, Lefevre PC, Rodwell AW, Smith GR. (1987).** Taxonomy of the *Mycoplasma mycoides* cluster. Israel Journal of Medical Sciences. 23(6), 632-635.

**Cottew GS, Yeats FR. (1978).** Subdivision of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* from cattle and goats into two types. Australian Veterinary Journal. 54(6), 293-296.

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

**Cowan MM. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews. 12(4), 564-582.

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

**DaMassa AJ, Brooks DL, Holmberg CA, Moe AI. (1987a).** Caprine mycoplasmosis: an outbreak of mastitis and arthritis requiring the destruction of 700 goats. Veterinary Record. 120(17), 409-413.

**DaMassa AJ, Holmberg CA, Brooks DL. (1987b).** Comparison of caprine mycoplasmosis caused by *Mycoplasma capricolum*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*, and *Mycoplasma putrefaciens*. Israel Journal of Medical Sciences. 23(6), 636-640.

**DaMassa AJ, Tully JG, Rose DL, Pitcher D, Leach RH, Cottew GS. (1994).** *Mycoplasma auris* sp. nov., *Mycoplasma cottewii* sp. nov., and *Mycoplasma yeatsii* sp. nov., new sterol-requiring mollicutes from the external ear canals of goats. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 44(3), 479-484.

**De la Fe C, Amores J, Gómez Martín A, Sánchez A, Contreras A, Corrales JC. (2009a).** *Mycoplasma agalactiae* detected in the semen of goat bucks. *Theriogenology*. 72, 1278-1281.

**De la Fe C, Assunção P, Gutiérrez C, Ramírez AS, Poveda C, Fabelo F, Poveda JB. (2009b).** Survey of antibodies to *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (large colony type) in dromedaries (*Camelus dromedarius*) in close contact with an infected goat population. *Journal of Arid Environments*. 73, 594–595.

**Dégrange S, Renaudin H, Charron A, Pereyre S, Bébéar C, Bébéar CM. (2008).** Reduced susceptibility to tetracyclines is associated in vitro with the presence of 16S rRNA mutations in *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 61(6), 1390-1392.

**Del Giudice R, Robillard N, Carski T. (1967).** Immunofluorescence identification of *Mycoplasma* on agar by use of incident illumination. *Journal of Bacteriology*. 93(4), 1205-1209.

**Del Giudice RA, Gardella RS. (1996).** Antibiotic treatment of mycoplasma-infected cell cultures. In: Tully J y Razin S (Eds.). *Molecular diagnostic procedures in mycoplasmaology*, Vol II. Inc. San Diego: Academic Press, pp. 439-444.

**Deng S, Hiruki C, Robertson J, 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 and Applications*. 1, 202-204.

**Déniz S. (1996).** Estudio de la agalaxia contagiosa caprina en las Islas Canarias. Tesis Doctoral, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. España.

**Devriese LA, Haesebrouck F. (1991).** Antibiotic susceptibility testing of *Mycoplasma bovis* using Tween 80 hydrolysis as an indicator of growth. *Zentralblatt Fur Veterinarmedizin*. Reihe B. 38(10), 781-783.

**Diner EJ1, Hayes CS. (2009).** Recombineering reveals a diverse collection of ribosomal proteins L4 and L22 that confer resistance to macrolide antibiotics. *Journal of Molecular Biology*. 386(2), 300-15.

**Dordet-Frisoni E, Baranowski E, Barré A, Blanchard A, Breton M, Couture C, Dupuy V, Gaurivaud P, Jacob D, Lemaitre C, Manso-Silván L, Nikolski M, Nouvel LX, Poumarat F, Sirand-Pugnet P, Thebault P, Theil S, Thiaucourt F, Citti C, Tardy F. (2013).** Draft Genome Sequences of *Mycoplasma auris* and *Mycoplasma yeatsii*, Two Species of the Ear Canal of *Caprinae*. *Genome Announcements*. 1(3), e00280.

**Drexler HG, Uphoff CC. (2002).** *Mycoplasma* contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology*. 39(2), 75-90.

**Dubosson C, Conzelmann C, Miserez R, Boerlin, Frey J, Zimmermann W, Hani H, Kuhnert P. (2004).** Development of two real-time PCR assays for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in clinical samples. *Veterinary Microbiology*. 102, 55-65.

**Duke JA, Godwin MJB, DuCellier J, Duke PNK. (2002).** Handbook of medicinal herbs. Washington, DC: CRC Press.

**Dupuy V, Manso-Silván L, Barbe V, Thebault P, Dordet-Frisoni E, Citti C, Poumarat F, Blanchard A, Breton M, Sirand-Pugnet P, Thiaucourt F. (2012).** Evolutionary history of contagious bovine pleuropneumonia using next generation sequencing of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* "Small Colony". *PLoS One*. 7(10), e46821.

**Edward DG. (1953).** Organisms of the pleuropneumonia group causing disease in goats. *Veterinary Record*. 65, 873-874.

**Edward DG, Freundt EA. (1956).** The classification and nomenclature of organisms of the Pleuropneumonia group. *Journal of General Microbiology*. 14, 197-207.

**Edward DG, Freundt EA. (1967).** Proposal for *Mollicutes* as name of the class established for the order *Mycoplasmatales*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 17, 267-268.

**Edward D, Moore W. (1975).** A method for determining the utilization of glucose by *Mycoplasmas*. Journal of Medical Microbiology. 8(3), 451-454.

**Egwu GO, Aliyu MM. (1997).** Preliminary comparative studies on complement fixation, dot enzyme immunoassay, and western blotting for the detection of antibodies to *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* SC in Nigerian camel (*Camelus dromedarius*). Acta Veterinaria Hungarica. 45, 111-118.

**El-Deeb W, Almujailli A A, Eljalii I, Elmoslemany A, Fayez M. (2017).** Contagious caprine pleuropneumonia: The first isolation and molecular characterization of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* in the Kingdom of Saudi Arabia. Acta Tropica. 168, 74-79.

**Elfaki MG, Abbas B, Mahmoud OM, Kleven SH. (2002).** Isolation and characterization of *Mycoplasma arginini* from camels (*Camelus dromedarius*) with pneumonia. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases. 25, 49-57.

**Erdmann T. (1976).** Untersuchungen zur Morphologie, Vermehrung und Beweglichkeit von *Mycoplasma gallisepticum*. Tesis Doctoral, Johannes Gutenberg Universität. Alemania.

**Ernø H. (1987).** Mycoplasmosis of ruminants: a general introduction. Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties. 6(3), 553-563.

**Erno H, Stipkovits L. (1973).** Bovine Mycoplasmas: cultural and biochemical studies. I. Acta Veterinaria Scandinavica. 14(3), 436-439.

**Ettayebi M, Prasad SM, Morgan EA. (1985).** Chloramphenicol-erythromycin resistance mutations in a 23S rRNA gene of *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology. 162(2), 551-557.

**Fabricant J, Freundt E. (1967).** Importance of extension and standardization of laboratory tests for the identification and classification of *Mycoplasma*. Annals of the New York Academy of Sciences. 143(1), 50-58.

**Firrao G, Brown DR. (2013).** International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of *Mollicutes*: Minutes of the meetings, July 15th and 19th 2012, Toulouse, France. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 63, 2361-2364.

**Fischer S, Lerman L. (1983).** DNA Fragments Differing by Single Base-Pair Substitutions are Separated in Denaturing Gradient Gels: Correspondence with Melting Theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 80, 1579-1583.

**Fischer A, Shapiro B, Muriuki C, Heller M, Schnee C, Bongcam-Rudloff E, Vilei EM, Frey J, Jores J. (2012).** The origin of the 'Mycoplasma mycoides cluster' coincides with domestication of ruminants. *PLoS One.* 7(4), e36150.

**Freundt E, Ernø H, Lemcke R. (1979).** Identification of *Mycoplasmas*. In: Bergan T, Norris J (Eds.). *Methods in Microbiology*, Vol. 13. New York: Academic Press, pp. 377-434.

**Freundt E. (1983).** Films and Spot production. In: Razin S y Tully J (Eds.). *Methods in Mycoplasmaology*, Vol. I. New York: Academic Press, pp. 323-374.

**Frey J. (1998).** Preface. In: Stipkovits L, Rosengarten R y Frey J (Eds.). *Mycoplasmas of Ruminants: Pathogenicity, Diagnostics, Epidemiology and Molecular Genetics*, Vol. 3. Luxembourg: European Cooperation on Scientific and Technical Research. pp. III.

**Furneri PM, Rappazzo G, Musumarra MP, Di Pietro P, Catania LS, Roccasalva LS. (2001).** Two new point mutations at A2062 associated with resistance to 16-membered macrolide antibiotics in mutant strains of *Mycoplasma hominis* *Antimicrob Agents Chemother.* 45(10), 2958-60.

**Gardella R, Del Giudice R, Tully J. (1983).** Immunofluorescence. In: S. Razin, y J. Tully (Eds.). *Methods in Mycoplasmaology*, Vol. I. New York: Academic Press, pp. 431-439.

**Garrity GM, Lilburn TG, Cole JR, Harrison SH, Euzéby J, Tindall BJ. (2007).** The Taxonomic Outline of the *Bacteria* and *Archaea*. Release 7.7, Part 11 – The Bacteria; [www.taxonomicoutline.org](http://www.taxonomicoutline.org).

**Gasparich GE, Whitcomb RF, Dodge D, French FE, Glass J, Williamson DL. (2004).** The genus *Spiroplasma* and its non-helical descendants: phylogenetic classification, correlation with phenotype and roots of the *Mycoplasma mycoides* clade. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 54(3), 893-918.

**Gdoura R, Kchaou W, Chaari C, Znazen A, Keskes L, Rebai T, Hammami A. (2007).** *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma genitalium* infections and semen quality of infertile men. *BMC Infectious Diseases*. 7, 129-137.

**Gharechahi J, Zahiri HS, Noghabi KA, Salekdeh GH. (2015).** In-depth diversity analysis of the bacterial community resident in the camel rumen. *Systematic and Applied Microbiology*. 38(1), 67-76.

**Gil MC, Peña FJ, Hermoso De Mendoza J, Gomez L. (2003).** Genital lesions in an outbreak of caprine contagious agalactia caused by *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma putrefaciens*. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*. 50(10), 484-7.

**Glew MD, Marena M, Rosengarten R, Citti C. (2002).** Surface diversity in *Mycoplasma agalactiae* is driven by site-specific DNA inversions within the *vpma* multigene locus. *Journal of Bacteriology*. 184(21), 5987-5998.

**Göbel U, Geiser A, Stanbridge E. (1987).** Oligonucleotide Probes Complementary to Variable Regions of Ribosomal RNA Discriminate between *Mycoplasma* species. *Journal of General Microbiology*. 133, 1969-1974.

**Goering R. (2010).** Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infection, Genetics and Evolution*. 10(7), 866-875.

**Gonçalves R, Regalla J, Nicolet J, Frey J, Nicholas R, Bashiruddin J, de Santis P, Gonçalves AP. (1998).** Antigen heterogeneity among *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC isolates: discrimination of major surface proteins. *Veterinary Microbiology*. 63(1), 13-28.

**Gourgues G, Barré A, Beaudoin E, Weber J, Magdelenat G, Barbe V, Schieck E, Jores J, Vashee S, Blanchard A, Lartigue C, Sirand-Pugnet P. (2016).** Complete Genome Sequence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *Mycoides* T1/44, a Vaccine Strain against Contagious Bovine Pleuropneumonia. *Genome Announcements*, 14, 4(2).

**Govindaraj S, Kumari BDR, Cioni PL, Flamini G. (2008).** Mass propagation and essential oil analysis of *Artemisia vulgaris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 105(3), 176-183.

**Gray MW, Sankoff D, Cedergren RJ. (1984).** On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*. 12(14), 5837-5852.

**Griffiths A, Lewontin R, Gelbart W, Miller J. (2002).** *Modern Genetic Analysis*. New York, U.S.A.: W. H. Freeman.

**Guo YH, Cheng ZM, Walla JA. (2000).** Amplification of the 23S rRNA gene and its application in the differentiation and detection of *Phytoplasmas*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. (4), 380-386.

**Gürtler V, Stanisich VA. (1996).** New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region *Microbiology*. 142 ( Pt 1), 3-16.

**Gürtler V. (1993).** Typing of *Clostridium difficile* strains by PCR-amplification of variable length 16S-23S rDNA spacer regions. *Journal of General Microbiology*. 139(12),3089-97.

**Gürtler V. (1999).** The role of recombination and mutation in 16S-23S rDNA spacer rearrangements. *Gene*. 238(1), 241-52.

**Gutell RR, Fox G. (1988).** A compilation of large subunit RNA sequences presented in a structural format. *Nucleic Acids Research*. 16, 175-269.

**Gutiérrez C, Corbera JA, Juste MC, Doreste F, Morales I. (2005).** An outbreak of abortions and high neonatal mortality associated with *Trypanosoma evansi* infection in dromedary camels in the Canary Islands. *Veterinary Parasitology*. 130, 163-168.

**Gutiérrez C, Desquesnes M, Touratier L, Büscher P. (2010).** *Trypanosoma evansi*: recent outbreaks in Europe. *Veterinary Parasitology*. 174, 26-29.

**Hackett KJ, Clark TB. (1989).** The ecology of *spiroplasmas*. In: Whitcomb RF y Tully JG (Eds). The Mycoplasmas, Vol. 5. Nueva York: Academic Press, pp.113-200.

**Haider F, Dwivedi PD, Naqvi AA, Bagchi GD. (2003).** Essential oil composition of *Artemisia vulgaris* harvested at different growth periods under Indo-Gangetic plain conditions. Journal of Essential Oil Research. 15, 376-378.

**Hall RE, Agarwal S, Kestler DP. (2000).** Induction of leukemia cell differentiation and apoptosis by recombinant P48, a modulín derived from *Mycoplasma fermentans*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 269(1), 284-289.

**Hall N. (2007).** Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. Journal of Experimental Biology. 210(9), 1518-1525.

**Hames C, Halbedel S, Hoppert M, Frey J, Stülke J. (2009).** Glycerol metabolism is important for cytotoxicity of *Mycoplasma pneumoniae*. Journal of Bacteriology. 191(3), 747-53.

**Hannan PC. (2000).** Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary *mycoplasma* species. International Research Programme on Comparative Mycoplasmaology. Veterinary Research. 31(4), 373-95.

**Harasawa R, Uemori T, Asada K, Kato I, Shiragami N. (1992).** 'boxA'-like sequence between the 16S/23S spacer in rRNA operon of mycoplasmas. FEBS Letters. 297(3), 209-211.

**Harasawa R, Mizusawa H, Nozawa K, Nakagawa T, Asada K, Kato I. (1993).** Detection and tentative identification of dominant *Mycoplasma* species in cell cultures by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer regions. Research in Microbiology. 144(6), 289-293.

**Harasawa R. (1996).** Nested PCR: Application to the detection of *Mycoplasmas*. In: Tully J y Razin S (Eds.). Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology: Diagnostic Procedures, Vol. 2. London: Academic Press, pp. 75-80.

## Bibliografia

---

**Harasawa R. (1999).** Genetic relationships among mycoplasmas based on the 16S-23S rRNA spacer sequence. *Microbiology and Immunology*. 43(4), 373-379.

**Harasawa R, Kanamoto Y. (1999).** Differentiation of two biovars of *Ureaplasma urealyticum* based on the 16S–23S rRNA intergenic spacer region. *Journal of Clinical Microbiology*. 37(12), 4135-4138.

**Harasawa R, Hotzel H, Sachse K. (2000).** Comparison of the 16S-23S rRNA intergenic spacer regions among strains of the *Mycoplasma mycoides* cluster, and reassessment of the taxonomic position of *Mycoplasma* sp. *bovine* group 7. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50, 1325-1329.

**Harasawa R, Pitcher DG, Ramirez AS, Bradbury JM. (2004).** A putative transposase gene in the 16S-23S rRNA intergenic spacer region of *Mycoplasma imitans*. *Microbiology*. 150(4), 1023-1029.

**Hatchel JM, Balish RS, Duley ML, Balish MF. (2006).** Ultrastructure and gliding motility of *Mycoplasma amphoriforme*, a possible human respiratory pathogen. *Microbiology*. 152(7), 2181-2189.

**Heldtander M, Pettersson B, Tully JG, Johansson KE. (1998).** Sequences of the 16S rRNA genes and phylogeny of the goat mycoplasmas *Mycoplasma adleri*, *Mycoplasma auris*, *Mycoplasma cottewii* and *Mycoplasma yeatsii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology*. 48, 263-268.

**Heller M, Gicheru N, Tjipura-Zaire G, Muriuki C, Yu M, Botelho A, Naessens J, Jores J, Liljander A. (2016).** Development of a Novel Cocktail Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and a Field-Applicable Lateral-Flow Rapid Test for Diagnosis of Contagious Bovine Pleuropneumonia. *Journal of Clinical Microbiology*. 54(6), 1557-1565.

**Higgins AJ. (1986).** The camel in health and disease. *British Veterinary Journal*. 142, 198-216.

**Hopert A, Uphoff C, Wirth M, Hauser H, Drexler H. (1993).** *Mycoplasma* detection by PCR analysis. *In Vitro Cell Developmental Biology*. 29A, 819-821.

**Hotzel H, Frey J, Bashiruddin J, Sachse K. (2003).** Detection and Differentiation of Ruminant Mycoplasmas. In: Sachse K y Frey J (Eds.). *Methods in Molecular Biology - PCR Detection of Microbial Pathogens: Methods and Protocols*, Vol. 216. Totowa, NJ, USA: Humana Press Inc, pp. 231-245.

**Houpikian P, Raoult D. (2001).** 16S/23S rRNA intergenic spacer regions for phylogenetic analysis, identification, and subtyping of Bartonella species. *Journal of Clinical Microbiology*. 39(8), 2768-78.

**Howard CJ, Gourlay RN. (1978).** *Mycoplasma* of animals. *Science Progress*. 65, 313-329.

**Huggett A, Nixon D. (1957).** Use of glucose oxidase, peroxidase, and O-dianisidine in determination of blood and urinary glucose. *Lancet*. 270, 368-370.

**Hung AL, Alvarado A, Lopez T, Perales R, Li O, García E. (1991).** Detection of antibodies to mycoplasmas in South American camelids. *Research in Veterinary Science*. 51(3), 250-253.

**Hunt DE, Klepac-Ceraj V, Acinas SG, Gautier C, Bertilsson S, Polz MF. (2006).** Evaluation of 23S rRNA PCR Primers for Use in Phylogenetic Studies of Bacterial Diversity. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(3), 2221–2225.

**Into T, Okada K, Inoue N, Yasuda M, Shibata K. (2002).** Extracellular ATP regulates cell death of lymphocytes and monocytes induced by membrane-bound lipoproteins of *Mycoplasma fermentans* and *Mycoplasma salivarium*. *Microbiology and Immunology*. 46(10), 667-675.

**Islamuddin M, Chouhan G, Tyagi M, Abdin MZ, Sahal D, Afrin F. (2014).** Leishmanicidal activities of *Artemisia annua* leaf essential oil against Visceral Leishmaniasis. *Frontiers Microbiology*. 5, 626.

**Iwami M, Muto A, Yamao F, Osawa S. (1984).** Nucleotide sequence of the rrnB 16S ribosomal RNA gene from *Mycoplasma capricolum*. *Molecular and General Genetics*. 196(2), 317-322.

**Jensen J, Borre M, Dohn B. (2003).** Detection of *Mycoplasma genitalium* by PCR amplification of the 16S rRNA gene. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(1), 261-266.

**Johansson KE, Heldtander MU, Pettersson B. (1998).** Characterization of mycoplasmas by PCR and sequence analysis with universal 16S rDNA primers. *Methods in Molecular Biology*. 104, 145-65.

## Bibliografia

---

**Johansson KE, Pettersson B. (2002).** Taxonomy of Mollicutes. In: Razin S y Herrmann R (Eds.). Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. New York: Springer, pp. 1-21.

**Jores J, Fischer A, Sirand-Pugnet P, Thomann A, Liebler-Tenorio E M, Schnee C, Frey J. (2013).** *Mycoplasma feriruminatoris* sp. nov., a fast-growing *Mycoplasma* species isolated from wild *Caprinae*. Systematic and Applied Microbiology. 36(8), 533-538.

**Judzentiene A and Buzelyte J. (2006).** Chemical composition of essential oils of *Artemisia vulgaris* L. (mugwort) from plants grown in North Lithuania. Chemija. 17, 12-15.

**Kahane I, Tully J. (1976).** Binding of plant lectins to *Mycoplasma* cells and membranes. Journal of Bacteriology. 128(1), 1-7.

**Kama-Kama F, Midiwo J, Nganga J, Maina N, Schiek E, Omosa L K, Naessens J. (2016).** Selected ethno-medicinal plants from Kenya with in vitro activity against major African livestock pathogens belonging to the "*Mycoplasma mycoides* cluster". Journal of Ethnopharmacology. 192, 524-534.

**Kapoor PK, Garg DN, Mahajan SK. (1989).** Isolation of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (LC variant, Y-Goat) from naturally aborted bovine fetuses. Theriogenology. 32(4), 683-691.

**Kerstens K, Pot B, Dewettinck D, Torck U, Vancanneyt M, Vauterin L, Vandamme P. (1994).** Identification and typing of bacteria by protein electrophoresis. In: Priest F, Ramos-Cormenzana A y Tyndall B (Eds.). Bacterial diversity and systematics. New York: Springer, pp. 51-66.

**Khan AU, Gilani AH. (2009).** Antispasmodic and bronchodilator activities of *Artemisia vulgaris* are mediated through dual blockade of muscarinic receptors and calcium influx. Journal of Ethnopharmacology. 126(3), 480-486.

**Kidanemariam A, Gouws J, van Vuuren M, Gummow B. (2005).** *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma mycoides mycoides* large colony and *Arcanobacterium pyogenes* isolated from clinical cases of ulcerative balanitis and vulvitis in Dorper sheep in South Africa. Journal of the South African Veterinary Association. 76(4), 204-208.

**Kirchhoff H, Rosengarten R. (1984).** Isolation of a motile *mycoplasma* from fish. *Journal of General Microbiology*. 130, 2439-2445.

**Kirchhoff H, Rosengarten R, Lotz W. (1984).** Flask-shaped mycoplasmas: Properties and pathogenicity for man and animals. *Israel Journal of Medical Sciences*. 20(9), 848-853.

**Klieneberger-Nobel, E. (1962).** *Pleuropneumonia-Like Organisms (PPLo) Mycoplasmataceae*. Academic Press, New York, NY.

**Kobayashi H, Nakajima H, Shimizu Y, Eguchi M, Hata E, Yamamoto K. (2005).** Macrolides and lincomycin susceptibility of *Mycoplasma hyorhinis* and variable mutation of domain II and V in 23S ribosomal RNA. *Journal of Veterinary Medical Science*. 67(8), 795-800.

**Kokotovic B, Friis N, Ahrens P. (2002).** Characterization of *Mycoplasma hyosynoviae* strains by amplified fragment length polymorphism analysis, pulsed-field gel electrophoresis and 16S ribosomal DNA sequencing. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*. 49(5), 245-252.

**Kong F, James G, Gordon S, Zelynski A, Gilbert GL. (2001).** Species-Specific PCR for Identification of Common Contaminant *Mollicutes* in Cell Culture. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(7), 3195-3200.

**Kostanjšek R, Štrus J, Avguštin G. (2007).** "Candidatus Bacilloplasma," a Novel lineage of *Mollicutes* Associated with the Hindgut Wall of the Terrestrial Isopod *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). *Applied and Environmental Microbiology*. 73, 5566-5573.

**Krasteva I, Liljander A, Fischer A, Smith DG, Inglis NF, Scacchia M, Pini A, Jores J, Sacchini F. (2014).** Characterization of the in vitro core surface proteome of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*, the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia. *Veterinary Microbiology*. 168(1), 116-123.

**Kumar S, Tamura K, Nei M. (2004).** MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*. 5, 150-163.

**Lane DJ, Pace B, Olsen GJ. (1985).** Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 82(20), 6955-6959.

**Le Grand D, Saras E, Blond D, Solsona M, Poumarat F. (2004).** Assessment of PCR for routine identification of species of the *Mycoplasma mycoides* cluster in ruminants. *Veterinary Research.* 35(6), 635-649.

**Leach RH. (1967).** Comparative studies of *mycoplasma* of bovine origin. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 143(1), 305-316.

**Leach RH, Ernø H, MacOwan KJ. (1993).** Proposal for designation of F38-type caprine mycoplasmas as *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* subsp. nov. and consequent obligatory relegation of strains currently classified as *M. capricolum* (Tully, Barile, Edward, Theodore, and Ernø 1974) to an additional new subspecies, *M. capricolum* subsp. *capricolum* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology.* 43(3), 603-605.

**Leclercq R. (2002).** Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clinical Infectious Diseases* 34, 482-492.

**Lee DH, Miles RJ, Inal JR. (1987).** Antibiotic sensitivity and mutation rates to antibiotic resistance in *Mycoplasma mycoides* ssp. *mycoides*. *Epidemiology and Infection.* 98(3), 361-368.

**Lerman L, Beldjord C. (1999).** Comprehensive mutation detection with denaturing gradient gel electrophoresis. In: Cotton R, Edkins E y Forrest S (Eds.). *Mutation Detection.* New York: Oxford University Press, pp. 35-61.

**Li SL, Sun HM, Zhao HQ, Cao L, Yuan Y, Feng YL, Xue GH. (2012).** A single tube modified allele-specific-PCR for rapid detection of erythromycin-resistant *Mycoplasma pneumoniae* in Beijing. *Chinese Medical Journal (Engl).* 125(15), 2671-2676.

**Lindstedt B. (2005).** Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis.* 26(13), 2567-2582.

**Lo SC, Hayes MM, Tully JG, Wang RY, Kotani H, Pierce PF, Rose DL, Shih JW. (1992).** *Mycoplasma penetrans* sp. nov., from the urogenital tract of patients with AIDS. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 42(3), 357-364.

**López A, de Tangil MS, Vega-Orellana O, Ramírez AS, Rico M. (2013).** Phenolic constituents, antioxidant and preliminary antimycoplasmic activities of leaf skin and flowers of Aloe vera (L.) Burm. f. (syn. A. barbadensis Mill.) from the Canary Islands (Spain). *Molecules*. 18(5), 4942-4954.

**Lorenzon S, David A, Nadew M, Wesonga H, Thiaucourt F. (2000).** Specific PCR identification of the T1 vaccine strains for contagious bovine pleuropneumonia. *Molecular and Cellular Probes*. 14(4), 205-210.

**Loria GR, Sammartino C, Nicholas RA, Ayling RD. (2003).** *In vitro* susceptibilities of field isolates of *Mycoplasma agalactiae* to oxytetracycline, tylosin, enrofloxacin, spiramycin and lincomycin-spectinomycin. *Research in Veterinary Science*. 75(1), 3-7.

**Lucier TS, Heitzman K, Liu SK, Hu PC. (1995).** Transition mutations in the 23S rRNA of erythromycin-resistant isolates of *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 39(12), 2770-3.

**Lucier T, Narita M, Yamada S, Izumikawa K, Umetsu M, Kenri T, Saaki Y, Arakawa Y. (2001).** Transition Mutations in the 23S rRNA of Erythromycin-Resistant Isolates of *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 39(12), 2770-2773.

**Ludwig W, Kirchhof G, Klugbauer N, Weizenegger M, Betzl D, Ehrmann M, Hertel C, Jilg S, Tatzel R, Zitzelsberger H, Liebl S, Hochberger M, Shah J, Lane D, Wallnofer PR, Scheifer KH. (1992).** Complete 23S ribosomal RNA sequences of gram-positive bacteria with a low DNA G + C content. *Systematic and Applied Microbiology*. 15(4), 487-501.

**Ludwig W, Rosselló-Mora R, Aznar R, Klugbauer S, Spring S, Reetz K, Beimfohr C, Brockmann E, Kirchhof G, Dorn S, Bachleitner M, Klugbauer N, Springer N, Lane D, Nietupsky R, Weizenegger M, Schleifer KH. (1995).** Comparative sequence analysis of 23S rRNA for Proteobacteria. *Systematic and Applied Microbiology*. 18(2), 164-188.

**Ludwig W, Strunk O, Klugbauer S, Klugbauer N, Weizenegger M, Neumaier J, Bachleitner M, Schleifer KH. (1998).** Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis*. 19(4), 554-68.

**Ludwig W, Schleifer KH. (1994).** Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Rev.* 1994 Oct;15(2-3):155-73.

**Ludwig W, Schleifer KH. (2005).** Molecular phylogeny of bacteria based on comparative sequence analysis of conserved genes. In: Sapp J (Ed.). *Microbial Phylogeny and Evolution, Concepts and Controversies*. New York: Oxford University Press, pp. 70-98.

**Ludwig W, Schleifer KH, Whitman WB. (2009).** Revised road map to the *phylum Firmicutes*. In: De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH y Whitman WB (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 3, The Firmicutes*. New York: Springer, pp. 1-13.

**Lysnyansky I, Gerchman I, Flaminio B, Catania S. (2015).** Decreased Susceptibility to Macrolide-Lincosamide in *Mycoplasma synoviae* Is Associated with Mutations in 23S Ribosomal RNA. *Microbiology Drug Resistance*. 21(6), 581-9.

**Lysnyansky I, Ayling RD. (2016).** *Mycoplasma bovis*: Mechanisms of Resistance and Trends in Antimicrobial Susceptibility. *Frontiers in Microbiology*, 27(7),595.

**MacOwan KJ, Minette JE. (1976).** A mycoplasma from acute contagious caprine pleuropneumonia in Kenya. *Tropical Animal Health and Production*. 8(2), 91-95.

**Maes D, Segales J, Meyns T, Sibila M, Pieters M and Haesebrouck F. (2008).** Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Veterinary Microbiology*, 126, 297-309.

**Maiden M, Bygraves J, Feil E, Morelli G, Russell J, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt B. (1998).** Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95(6), 3140-3145.

**Manso-Silván L, Terrier X, Thiaucourt F. (2007).** Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster based on analysis of five conserved protein-coding sequences and possible implications for the taxonomy of the group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57, 2247-2258.

**Manso-Silván L, Viles EM, Sacase K, Djordjevic SP, Thiaucourt F, 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*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59, 1353-1358.

**Manso-Silván, L, Dupuy V, Chu Y, Thiaucourt F. (2011).** Multi-locus sequence analysis of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* for the molecular epidemiology of contagious caprine pleuropneumonia. *Veterinary Research*. 42, 86-96.

**March JB, Kerr K, Lema B. (2003).** Rapid detection of contagious bovine pleuropneumonia by a *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC capsular polysaccharide-specific antigen detection latex agglutination test. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 10(2), 233-240.

**Mardassi BB, Mohamed RB, Gueriri I, Boughattas S, Mlik B. (2005).** Duplex PCR to differentiate between *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum* on the basis of conserved species-specific sequences of their hemagglutinin genes. *J Clin Microbiol*. Feb;43(2):948-58.

**Marois C, Dory D, Fablet C, Madec F, Kobisch M. (2010).** Development of a quantitative Real-Time TaqMan PCR assay for determination of the minimal dose of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 116 required to induce pneumonia in SPF pigs. *Journal of Applied Microbiology*. May;108(5):1523-33.

**Marshall AJ, Miles RJ, Richards L. (1995).** The phagocytosis of mycoplasmas. *Journal of Medical Microbiology*. 43(4), 239-350.

**Mayor D, Jores J, Korczak B, Kuhnert P. (2008).** Multilocus sequence typing (MLST) of *Mycoplasma hyopneumoniae*: a diverse pathogen with limited clonality. *Veterinary Microbiology*. 127(1-2), 63-72.

**Mbulu R-S, Tjipura-Zaire G, Lelli R, Frey J, Pilo P, Vilei EM, Mettler F, Nicholas RAI, Huebschle OJB. (2004).** Contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) caused by vaccine strain T1/44 of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Veterinary Microbiology* 98, 229–234

**McAuliffe L, Ellis RJ, Ayling RD, Nicholas RA. (2003).** Differentiation of *Mycoplasma* species by 16S ribosomal DNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(10), 4844-4847.

**McAuliffe L, Ellis RJ, Lawes JR, Ayling RD, Nicholas RA. (2005).** 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis; a single generic test for detecting and differentiating *Mycoplasma* species. *Journal of Medical Microbiology*. 54(8), 731-739.

**McAuliffe L, Gosney F, Hlusek M, de Garnica M, Spargser J, Kargl M, Rosengarten R, Ayling RD, Nicholas RA, Ellis R. (2011).** Multilocus sequence typing of *Mycoplasma agalactiae*. *Journal of Medical Microbiology*. 60(6), 803-811.

**Mederos-Iriarte LE, Poveda JB, Poveda CG, Vega-Orellana OM, Gutiérrez C, Corbera JA, Ramírez AS. (2014).** Mycoplasma detection and isolation from one-humped camels (*Camelus dromedarius*). *Tropical Animal Health and Production*. 46, 1317-1320.

**Mentaberre G, Gutiérrez C, Rodríguez NF, Joseph S, González-Barrio D, Cabezón O, de la Fuente J, Gortazar C, Boadella M. (2013).** A transversal study on antibodies against selected pathogens in dromedary camels in the Canary Islands, Spain. *Veterinary Microbiology*. 167, 468-473.

**Miles RJ. (1983).** Effect of some cultural factors on T<sub>1</sub> broth vaccine for contagious bovine pleuropneumonia. *Tropical Animal Health and Production*. 15, 144-148.

**Miles R, Agbanyim C. (1998).** Determination of substrate utilization rates by Mycoplasmas. In: Miles R y Nicholas R (Eds.). *Methods in Molecular Biology: Mycoplasma Protocols*, Vol. 104. Totowa: Humana Press, pp. 95-103.

**Miles K, McAuliffe L, Persson A, Ayling R, Nicholas R. (2005).** Insertion sequence profiling of UK *Mycoplasma bovis* field isolates. *Veterinary Microbiology*. 107, 301-306.

**Minion FC, Rosenbusch RF. (1993).** Extra membranous structure in mycoplasmas. *Subcellular Biochemical*. 20, 189-201.

**Mitchell JD, Goh S, McKellar QA, McKeever DJ. (2013).** *In vitro* pharmacodynamics of gamithromycin against *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* Small Colony. *Veterinary Journal*. 197(3),806-11.

**Miyata M. (2010).** Unique Centipede Mechanism of *Mycoplasma* Gliding. *Annual Review of Microbiology*. 64, 519-537.

**Mueller U, Wolfenbarger L. (1999).** AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology & Evolution*. 14(10), 389-394.

**Murray GL, Bradshaw CS, Bissessor M, Danielewski J, Garland SM, Jensen JS, Fairley CK, Tabrizi SN. (2017).** Increasing Macrolide and Fluoroquinolone Resistance in *Mycoplasma genitalium*. *Emerging Infectious Diseases* 23 (5),809-812.

**Muyzer G, De Waal E, Uitterlinden A. (1993).** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(3), 695-700.

**Neimark HC. (1979).** Phylogenetic relationships between mycoplasmas and other prokaryotes. In: Barile MF y Razin S (Eds.). *The Mycoplasmas*. Vol. 1. New York: Academic Press, pp. 43-61.

**Nicholas R. (2004).** Contagious agalactia. In: *Manual of standards for diagnostics tests and vaccines for terrestrial animals*, Vol. II. OIE, Paris.

**Nicholas MM, Stalis IH, Clippinger TL, Busch M, Nordhausen R, Maalouf G, Schrenzel MD. (2005).** Systemic disease in Vaal rhebok (*Pelea capreus*) caused by mycoplasmas in the *mycoides* cluster. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(3), 1330-1340.

## Bibliografia

---

**Nicholas RA, Lin YC, Sachse K, Hotzel H, Parham K, McAuliffe L, Miles RJ, Kelly DP, Wood AP. (2008).** Proposal that the strains of the *Mycoplasma* ovine/caprino serogroup 11 be reclassified as *Mycoplasma bovis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 58(1), 308-312.

**Nicholas R, Ayling R, McAuliffe L. (2008).** Mycoplasma diseases of ruminants (CAB Books). UK: CABI.

**Nicholas R, Churchward C. (2012).** Contagious caprine pleuropneumonia: new aspects of an old disease. Transboundary and Emerging Diseases. 59(3), 189-196.

**Nocard EI, Roux E. (1896).** Le microbe of the Péripleurmonie. Annales l'Institut Pasteur. 12, 204-262.

**Nowak J. (1929).** Morphologie, nature et cycle évolutif du microbe de la péripleurmonie des bovidés. Annales de l'Institut Pasteur. 43, 1330-1352.

**Okazaki N, Narita M, Yamada S, Izumikawa K, Umetsu M, Kenri T, Sasaki Y, Arakawa Y, Sasaki T. (2001).** Characteristics of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains isolated from patients and induced with erythromycin in vitro. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 39 (12), 2770-2773.

**Olsen GJ, Woese CR. (1993).** Ribosomal RNA: a key to phylogeny. The FASEB Journal. 7, 113-123.

**Oshima K, Maejima K, Namba S. (2013).** Genomic and evolutionary aspects of phytoplasmas. Frontiers in Microbiology. 4, 230-237.

**Palau-Ribes F M, Enderlein D, Hagen N, Herbst W, Hafez H M, Lierz M. (2016).** Description and prevalence of *Mycoplasma ciconiae* sp. nov. isolated from white stork nestlings (*Ciconia ciconia*). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 66(9), 3477-3484.

**Paling RW, Macowan KJ, Karstad L. (1978).** The prevalence of antibody to contagious caprine pleuropneumonia (*Mycoplasma* strain F38) in some wild herbivores and camels in Kenya. Journal of Wildlife Diseases. 14, 305-308.

**Pei A, Nossa CW, Chokshi P, Blaser MJ, Yang L, Rosmarin DM, Pei Z. (2009).** Diversity of 23S rRNA genes within individual prokaryotic genomes. PLoS One. 4(5), e5437.

**Penner G, Bush A, Wise R, Kim W, Domier L, Kasha K, Laroche A, Scoles G, Molnar SJ, Fedak G. (1993).** Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PCR Methods and Applications*. 2(4), 341-345.

**Pereyre S, Gonzalez P, De Barbeyrac B, Darnige A, Renaudin H, Charron A, Raheison S, Bébéar C, Bébéar CM. (2002).** Mutations in 23S rRNA account for intrinsic resistance to macrolides in *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma fermentans* and for acquired resistance to macrolides in *M. hominis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46(10), 3142-3150.

**Peyere S, Goret J, Bébéar C. (2016).** *Mycoplasma pneumoniae*: current knowledge on macrolide resistance and treatment. *Frontiers in Microbiology*. 7: 974

**Perrin J, Müller M, Zangger N, Nicolet J. (1994).** Infection with *Mycoplasma mycoides* ssp. *mycoides* LC (large colony type) in bezoar goat kids (*Capra aegagrus cretica*) in the Bern (Switzerland) Zoo. *Schweizer Archiv Fur Tierheilkunde*. 136(8), 270-274.

**Perreau, P. (1979).** Les mycoplasmoses de la chevre. *Cahiers de Médecine Vétérinaire*. 48, 71-85.

**Pettersson B, Leitner T, Ronaghi M, Bölske G, Uhlen M, Johansson KE. (1996).** Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster as determined by sequence analysis of the 16S rRNA genes from the two rRNA operons. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 178, 4131-4142.

**Pettersson B, Tully J, Bölske G, Johansson K. (2000).** Updated phylogenetic description of the *Mycoplasma hominis* cluster (Weisburg et al., 1989) based on 16S rDNA sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50(1), 291-301.

**Pettersson B, Tully J G, Bölske G, Johansson KE. (2001).** Reevaluation of the classical *Mycoplasma lipophilum* cluster (Weisburg et al. 1989) and description of two new clusters in the *Hominis* group based on 16S rDNA sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51, 633-643.

**Pilo P, Fleury B, Marenda M, Frey J, Vilei E. (2003).** Prevalence and distribution of the insertion element ISMag1 in *Mycoplasma agalactiae*. *Veterinary Microbiology*. 92(1-2), 37-48.

## Bibliografía

---

**Pitcher DG, Nicholas RAJ. (2005).** Mycoplasma host specificity: fact or fiction? *The Veterinary Journal*. 170(3), 300-306.

**Pollack JD, Williams MV, McElhane RN. (1997).** The comparative metabolism of the mollicutes (*Mycoplasmas*): the utility for taxonomic classification and the relationship of putative gene annotation and phylogeny to enzymatic function in the smallest free-living cells. *Critical Reviews in Microbiology*. 23(4), 269-354.

**Poumarat F, Martel JL. (1989).** *In vitro* antibiotic sensitivity of French strains of *Mycoplasma bovis*. *Annales de Recherches Veterinaires*. 20(2), 145-152.

**Poveda J. (1998).** Biochemical characteristics in *Mycoplasma* identification. In: Miles R y Nicholas R (Eds.). *Methods in Molecular Biology: Mycoplasma Protocols*, Vol. 104. Totowa: Human Press, pp. 69-78.

**Poveda JB, Nicholas R. (1998).** Serological identification of *Mycoplasmas* by growth and metabolic inhibition tests. In: Miles R y Nicholas R (Eds.). *Methods in Molecular Biology: Mycoplasma Protocols*, Vol. 104. Totowa: Human Press, pp. 105-111.

**Poveda JB, Ramírez AS, De la Fe C, Assunção P, Díaz-Bertrana L. (2002).** Mycoplasmas. In: Vadillo SM, Píriz SD, Mateos EMY (Eds.). *Manual de Microbiología*. Madrid, Spain: McGraw-Hill, pp. 423-430.

**Prescott L, Harley J, Klein D. (2004).** *Microbiología*. Madrid: McGraw-Hill.

**Ramírez AS, González M, Déniz S, Fernández A, Poveda JB. (1997).** Evaluation of a modified SP-4 medium in the replication of *Mycoplasma* spp. In: Frey J, Sarris K (Eds.). *Mycoplasmas of Ruminants: Pathogenicity, Diagnostics, Epidemiology and Molecular Genetics*, Vol. 2. Luxembourg: European Cooperation on Scientific and Technical Research, pp. 36-39.

**Ramírez AS. (1999).** Desarrollo de dos medios de cultivo para la replicación de microorganismos de la clase *Mollicutes*. Tesis Doctoral, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. España.

**Ramírez AS, Clive J, Naylor Philip P, Hammond, Janet M Bradbury (2006).** Development and evaluation of a diagnostic PCR for *Mycoplasma synoviae* using primers located in the intergenic spacer region and the 23S rRNA gene. *Veterinary Microbiology*. 118, 76-82.

**Ramírez AS, Naylor CJ, Pitcher DG, Bradbury JM. (2007).** High inter-species and low intra-species variation in 16S-23S rDNA spacer sequences of pathogenic avian mycoplasmas offers potential use as a diagnostic tool. *Veterinary Microbiology*. 128, 279-287.

**Ramírez AS, Sachse K, Hotzel H, Bradbury J M. (2008a).** Analysis of the 23S rDNA of avian mycoplasmas. Abstracts: 17<sup>th</sup> Congress of the International Organization for Mycoplasmaology, Tiajin, China.

**Ramírez AS, Fleitas JL, Rosales RS, Poveda C, de la Fe C, Andrada M, Castro A, Poveda JB. (2008b).** A semi-defined medium without serum for small ruminant mycoplasmas. *Veterinary Journal*. 178(1), 149-52.

**Ramírez AS, Yavari C, Dare C, 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 (Eds., Abstracts: 18th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology. Chianciano Terme, Siena, Italia.

**Ramírez AS, Naylor C, Yavari C, Dare C, Bradbury J. (2011).** Analysis of the 16S to 23S rRNA intergenic spacer region of *Mycoplasma synoviae* field strains. *Avian Pathology*. 40(1), 79-86.

**Ramírez AS, Dare C, Yavari C, 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 Pathology*. 41(3), 317-322.

**Razin S. (1974).** Correlation of cholesterol to phospholipid content in membranes of growing mycoplasmas. *FEBS Letters*. 47, 81-84.

**Razin S. (1978).** The mycoplasmas. *Microbiology Reviews*. 42(2), 414-470.

**Razin S. (1983).** Urea hydrolisis. In: Razin S y Tully J (Eds.). *Methods in Mycoplasmaology*, Vol. I. New York: Academic Press, pp. 351-353.

## Bibliografía

---

**Razin S, Cirillo V. (1983).** Sugar Fermentation. In: Razin S y Tully J (Eds.). *Methods in Mycoplasmaology*, Vol. I. New York: Academic Press, pp. 337-343.

**Razin S, Freundt EA. (1984).** The mycoplasmas. In: Krieg NR y Holt JG (Eds.). *Bergey's manual systematic bacteriology*, vol I, 9ª edición. Baltimore: The Williams and Wilkins Co., pp. 740-770.

**Razin S. (1991).** The genera *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, and *Asteroleplasma*. In: Balows A, Truper HG, Dworkin M, Harder W y Schleifer KH (Eds.). *The Prokaryotes*, Vol. 2. New York, NY: Springer-Verlag, pp. 1937-1959.

**Razin S. (1992).** Mycoplasma Taxonomy and Ecology. In: Mamiloff J, McElhaney RN, Finch LR y Baseman JB (Eds.). *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis*. Washington, DC: American Society for Microbiology, pp. 3-22.

**Razin S, Yogev D, Naot Y. (1998).** Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62(4), 1094-1156.

**Raviv Z, Callison S, Ferguson-Noel N, Laibinis V, Wooten R, Kleven SH. (2007).** The *Mycoplasma gallisepticum* 16S-23S rRNA intergenic spacer region sequence as a novel tool for epizootiological studies. *Avian Diseases*. 51(2), 555-560.

**Razin S, Yogev D, Naot Y. (1998).** Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62(4), 1094-1156.

**Razin S, Hayflick L. (2010).** Highlights of mycoplasma research--an historical perspective. *Biologicals*. 38(2), 183-190.

**Real F, Déniz S, Acosta B, Ferrer O, Poveda JB. (1994).** Caprine contagious agalactia caused by *Mycoplasma agalactiae* in the Canary Islands. *Veterinary Record*. 135(1), 15-16.

**Rebelo A, Parker L, Cai H. (2011).** Use of high-resolution melting curve analysis to identify *Mycoplasma* species commonly isolated from ruminant, avian, and canine samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 23, 932-936.

**Robb ID. (1984).** Stereo-biochemistry and functions of polymers in microbial adhesion and aggregation. In: Marshall KC (Ed.). *Microbial Adhesion and Aggregation*. Berlin: Springer-Verlag, pp. 39-49.

**Roberts R. (2005).** How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102(5), 5905-5908.

**Robertson J, Smook E. (1976).** Cytochemical evidence of extramembranous carbohydrates on *Ureaplasma urealyticum* (T-strain *Mycoplasma*). *Journal of Bacteriology*. 128(2), 658-660.

**Rocha EP, Blanchard A. (2002).** Genomic repeats, genome plasticity and the dynamics of *Mycoplasma* evolution. *Nucleic Acids Research*. 30(9), 2031–2042.

**Rodicio M, Mendoza M. (2004).** Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: Principles, methods and applications in clinical microbiology. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 22, 238-245.

**Rodríguez JL, Poveda JB, Gutiérrez C, Acosta B, Fernández A. (1994).** Polyarthrititis in kids associated with *Mycoplasma putrefaciens*. *Veterinary Record*. 135(17),406-7.

**Rodríguez JL, Poveda JB, Orós J, Herráez P, Sierra MA, Fernández A. (1995a).** High mortality in goats associated with the isolation of a strain of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (Large Colony type). *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B*. 42(10), 587-593.

**Rodríguez JL, de los Monteros AE, Herráez P, Poveda JB, Fernández A. (1995b).** Isolation of *Mycoplasma mycoides*, *mycoides* (LC variant), from two naturally aborted caprine fetuses. *Theriogenology*. 44(7), 1003-1009.

**Rodríguez J, Gutiérrez C, Brooks D, Damassa A, Orós J, Fernández A. (1998).** A Pathological and Immunohistochemical Study of Goat Kids Undergoing Septicaemic Disease Caused by *Mycoplasma*

## Bibliografía

---

*capricolum* subsp. *capricolum*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (Large Colony Type). Journal of veterinary medicine. B. 45, 141–149.

**Rodwell AW, Mitchell A. (1979).** Nutrition, growth and reproduction. In: Barile MF y Razin S (Eds.). The *Mycoplasmas*, Vol. I. New York: Academic Press, pp. 103-139.

**Rodwell AW. (1983).** Introductory Remarks. In: Razin S and Tully J (Eds.). Methods in mycoplasmaology, vol. I. New York: Academic Press, pp. 93-97.

**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 Doctoral, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. España.

**Rosenbusch RF, Minion FC. (1992).** Cell envelope: Morphology and Biochemistry. In: Maniloff J, McElhane RN, Finch LR y Baseman JB (Eds.). *Mycoplasma: Molecular Biology and Pathogenesis*. Washington DC: American Society for Microbiology, pp. 549-559.

**Rosendal S, Black F. (1972).** Direct and indirect immunofluorescence of unfixed and fixed *Mycoplasma* colonies. Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica B Microbiology and Immunology. 80(4), 615-622.

**Röske K, Foecking MF, Yooseph S, Glass JI, Calcutt MJ, Wise KS. (2010).** A versatile palindromic amphipathic repeat coding sequence horizontally distributed among diverse bacterial and eucaryotic microbes. BMC Genomics. 11: 430-450.

**Roselló-Mora R, Amann R. (2001).** The species concept for prokaryotes. FEMS Microbiology Reviews. 25(1), 39-67.

**Rottem S, Kahane I. (1993).** *Mycoplasma* cell membranes. Subcellular Biochemistry, Vol. 20. New York: Springer, pp. 314.

**Rottem S. (2003).** Interaction of *Mycoplasmas* with host cells. Physiological Reviews. 83(2), 417-432.

**Rurangirwa FR, McGuire TC, Magnuson NS, Kibor A, Chema S. (1987).** Composition of a polysaccharide from mycoplasma (F-38) recognised by antibodies from goats with contagious pleuropneumonia. *Research in Veterinary Science.* 42(2), 175-178.

**Ryô Harasawa, Helmut Hotzel, Konrad Sachse. (2000).** Comparison of the 16S-23S rRNA intergenic spacer regions among strains of the *Mycoplasma mycoides* cluster, and reassessment of the taxonomic position of *Mycoplasma* sp. *bovine* group 7. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 50, 1325-1329.

**Sacchini F, Naessens J, Awino E, Heller M, Hlinak A, Haider W, Sterner-Kock A, Jores J. (2011).** A minor role of CD4T lymphocytes in the control of a primary infection of cattle with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. *Veterinary Research.* 42, 77-87.

**Samsudin AA, Evans PN, Wright AD, Al Jassim R. (2011).** Molecular diversity of the foregut bacteria community in the dromedary camel (*Camelus dromedarius*). *Environmental Microbiology.* 13(11), 3024-3035.

**Sashida H, Sasaoka F, Suzuki J, Fujihara M, Nagai K, Fujita H, Kadosaka T, Ando S, Harasawa R. (2013).** Two clusters among *Mycoplasma haemomuris* strains, defined by the 16S-23S rRNA intergenic transcribed spacer sequences. *The Journal of Veterinary Medical Science.* 75(5), 643-648.

**Sato T, Higuchi H, Yokota SI, Tamura Y. (2017).** *Mycoplasma bovis* isolates from dairy calves in Japan have reduced susceptibility to all approved macrolides, resulting from a point mutation (G748A) combined with multiple species-specific nucleotide alterations in 23S rRNA. *Microbiology and Immunology,* 15.

**Savva D. (1980).** A study of some factors affecting mutation rates in bacteria. Tesis Doctoral, University of London. Reino Unido.

**Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown P, Davis R. (1996).** Parallel human genome analysis: Microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 93, 10614-10619.

**Schnee C, Schulsse S, Hotzel H, Ayling R, Nicholas R, Schubert E, Heller M, Ehricht R, Sachse K. (2012).** A novel rapid DNA microarray assay enables identification of 37 *Mycoplasma* Species and highlights multiple mycoplasma infections. PLoS One. 7(3), e33237.

**Schieck E, Lartigue C, Frey J, Vozza N, Hegermann J, Miller R A, Valguarnera E, Muriuki C, Meens J, Nene V, Naessens J, Weber J, Lowary TL, Vashee S, Feldman MF, Naessens J. (2016).** Galactofuranose in *Mycoplasma mycoides* is important for membrane integrity and conceals adhesins but does not contribute to serum resistance. Molecular microbiology. 99(1), 55-70.

**Schimke R, Barile M. (1963).** Arginine metabolism in pleuropneumonia-like organisms isolated from mammalian cell culture. Journal of Bacteriology. 86, 195-206.

**Schulz U. (2008).** El camello en Lanzarote. Asociación para el Desarrollo Rural de Lanzarote, Aderlan.

**Seersholm FV, Fischer A, Heller M, Jores J, Sachse K, Mourier T, Hansen AJ. (2015).** Draft Genome Sequence of the First Human Isolate of the Ruminant Pathogen *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*. Genome Announcements. 3(3).

**Seidel KE, Gareis M. (1995).** Efficiency of microbank systems for the conservation of microorganisms relevant to veterinary medicine and others which are not easy to cultivate. Berlin and Munchen Tierärztliche Wochenschrift. 108(6), 215-220.

**Senterfit L. (1983).** Tetrazolium reduction. In: Razin S y Tully J (Eds.). Methods on Mycoplasmaology, Vol. I. New York: Academic Press, pp. 377-378.

**Shahram M, Nicholas R, Wood AP, Kelly DP. (2010).** Further evidence to justify reassignment of *Mycoplasma mycoides subspecies mycoides* Large Colony type to *Mycoplasma mycoides subspecies capri*. Systematic and Applied Microbiology. 33(1), 20-24.

**Shapiro M, London B, Nigri D, Shoss A, Zilber E, Fogel I. (2016).** Middle East respiratory syndrome coronavirus: review of the current situation in the world. Disaster and Military Medicine, 2(1), 9-13.

**Sheriff D, Piercy G. (1952).** Experiments with an avianised strain of the organism of contagious bovine pleuropneumonia. *Veterinary Research*, 64, 615–621.

**Sigmund CD, Morgan EA. (1982).** Erythromycin resistance due to a mutation in a ribosomal RNA operon of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(18), 5602-5606.

**Simmons GC, Johnston LAY. (1963).** Arthritis in calves caused by *Mycoplasma* species. *Australian Veterinary Journal*, 39, 11-14.

**Smart CD, Schneider B, Blomquist CL, Guerra LJ, Harrison NA, Ahrens U, Lorenz KH, Seemüller E, Kirkpatrick BC. (1996).** Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Applied and Environmental Microbiology*. 62, 2988–2993.

**Spergser J, Aurich C, Aurich JE, Rosengarten R. (2002).** High prevalence of mycoplasmas in the genital tract of asymptomatic stallions in Austria. *Veterinary Microbiology*. 87(2), 119-129.

**Spergser J, Rosengarten R. (2007).** Identification and differentiation of canine *Mycoplasma* isolates by 16S-23S rDNA PCR-RFLP. *Veterinary Microbiology*. 125, 170-174.

**Spergser J, Langer S, Muck S, Macher K, Szostak M, Rosengarten R, Busse HJ. (2011).** *Mycoplasma mucosicanis* sp. nov., isolated from the mucosa of dogs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 61, 716-721.

**Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity G, Grimont P, Kampfer P, Maiden M. (2002).** Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52, 1043-1047.

**Stakenborg T, Vicca J, Butaye P, Maes D, Minion FC, Peeters J, De Kruif A, Haesebrouck F. (2005).** Characterization of in vivo acquired resistance of *Mycoplasma hyopneumoniae* to macrolides and lincosamides. *Microbial Drug Resistance*. 11, 290-294.

## Bibliografía

---

**Stirling D. (2003).** Qualitative and Quantitative PCR - A Technical Overview. In: Bartlett J y Stirling D (Eds.), *Methods in Molecular Biology: PCR protocols*, Vol. 226. Totowa, NJ, USA: Humana Press Inc, pp. 181-184.

**Stradaoli G, Sylla L, Zelli R, Mazzarelli F, Rawadi G, Monaci M. (1999).** *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC identification by PCR in sperm of seminal vasculitis-affected bulls. *Veterinary Research*. 30, 457-466.

**Stratton CW. (2005).** Molecular Mechanisms of Action for Antimicrobial Agents: General Principles and Mechanisms for Selected Classes of Antibiotics. In: Lorian V (Ed.). *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Philadelphia, USA: Williams & Wilkins, pp. 532-563.

**Suárez-Pérez A, Ramírez AS, Rosales RS, Calabuig P, Poveda C, Rossello´- Móra R, Nicholas R, Poveda JB. (2012).** *Mycoplasma neophronis* sp. Nov., isolated from upper respiratory tract of Canarian Egyptian Vulture (*Neophron percnopterus majorensis*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 62, 1321-1325.

**Suárez-Pérez A. (2012).** Estudio taxonómico polifásico de bacterias del género *Mycoplasma* en aves silvestres: descripción de una nueva especie, *Mycoplasma neophronis*. Tesis Doctoral, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. España.

**Sung H, Kang SH, Bae YJ, Hong JT, Chung YB, Lee CK, Song S. (2006).** PCR-based detection of mycoplasma species. *Journal of Microbiology*. 44(1), 42-49.

**Sylla L, Stradiolo G, Manuali E, Rota A, Zelli R, Vincenti L, Monaci M. (2005).** The effect of *Mycoplasma mycoides* ssp. *mycoides* LC of bovine origin on in vitro fertilizing ability of bull spermatozoa and embryo development. *Animal Reproduction Science*. 85, 81-93.

**Takahashi-Omoe H, Omoe K, Matsushita S, Kobayashi H, Yamamoto K. (2004).** Polymerase chain reaction with a primer pair in the 16S-23S rRNA spacer region for detection of *Mycoplasma pulmonis* in clinical isolates. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 27(2), 117-128.

**Tamiozzo PJ, Estanguet AA, Maito J, Tirante L, Pol M, Giraudo JA. (2014).** Detection of *Mycoplasma canadense* and *Mycoplasma californicum* in dairy cattle from Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. Apr-Jun;46(2):119-21.

**Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. (2007).** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596-1599.

**Tang J, Hu M, Lee S, Roblin R. (2000).** A polymerase chain reaction based method for detecting *Mycoplasma/Acholeplasma* contaminants in cell culture. *Journal of Microbiological Methods*. 39, 121-126.

**Tardy F, Gaurivaud P, Tricot A, Maigre L, Poumarat F. (2009).** Epidemiological surveillance of mycoplasmas belonging to the '*Mycoplasma mycoides*' cluster: is DGGE fingerprinting of 16S rRNA genes suitable. *Letters in Applied Microbiology*. 48(2), 210-217.

**Tavío MM, Poveda C, Assunção P, Ramírez AS, Poveda JB. (2017).** In vitro activity of tylvalosin against Spanish field strains of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Record*. 175(21):539-543.

**Taylor-Robinson D, Brecht W. (1983).** Motility of *Mycoplasma* strain G37. *Yale Journal of Biology and Medicine*. 56, 910-911.

**Taylor-Robinson D. (1989).** The *Mycoplasmatales*: *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Acholeplasma*, *Spiroplasma*, and *Anaeroplasmata*. In: Balows A, Trüper H, Dworkin M, Harder W y Schleifer K (Eds.). *The Prokaryotes*. New York: Springer-Verlag, pp. 664-681.

**Thiaucourt F, Lorenzon S, David A, Breard A. (2000).** Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster as shown by sequencing of a putative membrane protein gene. *Veterinary Microbiology*. 72, 251-68.

**Thiaucourt F, Manso-Silvan L, Salah W, Barbe V, Vacherie B, Jacob D, Breton M, Dupuy V, Lomenech AM, Blanchard A, Sirand-Pugnet P. (2011).** *Mycoplasma mycoides*, from "*mycoides* Small Colony" to "*capri*". A microevolutionary perspective. *BMC Genomics*. 12, 114-133.

**Thomas P (1873).** Rapport mé'ical sur le Bou Frida. In: Jourdan A, ed. *Publication du gouvernement gé'ne'ral civil de l'Alge'rie*. Algiers.

**Thomas A, Linden A, Mainil J, Bischof DF, Frey J, Vilei EM. (2005).** *Mycoplasma bovis* shares insertion sequences with *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC: Evolutionary and developmental aspects. FEMS Microbiology Letters. 245(2), 249-255.

**Thompson JD, Higgins DG, Gibso TJ. (1994).** CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research. Vol. 22 (22), 4673-4680.

**Tibary A, Fite C, Anouassi A, Sghiri A. (2006).** Infectious causes of reproductive loss in camelids. Theriogenology. 66, 633-647.

**Tola S, Angioi A, Rocchigiani AM, Idini G, Manunta D, Galleri G, Leori G. (1997).** Detection of *mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples by polymerase chain reaction. Veterinary Microbiology. 54(1), 17-22.

**Tonelli A, Sacchini F, Krasteva I, Zilli K, Scacchia M, Beaurepaire C, Nantel A, Pini A. (2012).** One test microbial diagnostic microarray for identification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* and other *Mycoplasma* species. Molecular Biotechnology. 52(3), 285-299.

**Tourtellote M, Jacobs R. (1960).** Physiological and serologic comparisons of PPLO from various sources. Annals of the New York Academy of Sciences. 79, 521-530.

**Trichard CJV, Jordan P, Prozesky L, Jacosz EP, Henton MM. (1993).** The identification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC as the etiological agent of balanoposthitis and vulvovaginitis in sheep in South Africa. Onderstepoort Journal Veterinary Research. 60(1), 29-37.

**Tulasne JJ, Litamoi JK, Morein B, Dedieu L, Palya VJ, Yami M, Abusugra I, Sylla D, Bensaid A. (1996).** Contagious bovine pleuropneumonia vaccines: the current situation and the need for improvement. Revue scientifique et technique. 15(4), 1373-1396.

**Tully JG, Barile MF, Edward DG, Theodore TS, Ernø H. (1974).** Characterization of some caprine mycoplasmas, with proposals for new species, *mycoplasma capricolum* and *mycoplasma putrefaciens*. Journal of General Microbiology. 85(1), 102-120.

**Tully JG. (1983).** Test for digitonin sensitivity and sterol requirement. In: Razin S y Tully JG (Eds.). *Methods in Mycoplasma*, Vol. I. New York: Academic Press, pp. 355-362.

**Tully JG. (1995).** Culture medium formulation for primary isolation and maintenance of mollicutes. . In: Razin S y Tully JG (Eds.). *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma*, Vol. I: Molecular Characterization. London, UK: Academic Press Limited, pp. 33-40.

**Uemura R, Sueyoshi M, Nagatomo H. (2010).** Antimicrobial susceptibilities of four species of *Mycoplasma* isolated in 2008 and 2009 from cattle in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 72(12), 1661-1663.

**Uphoff CC, Drexler HG. (2002a).** Comparative antibiotic eradication of mycoplasma infections from continuous cell lines. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*. Vol. 38, 86-89.

**Uphoff CC, Drexler HG. (2002b).** Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*. 38, 79-85.

**Uphoff CC, Drexler HG. (2011).** Elimination of mycoplasmas from infected cell lines using antibiotics. *Methods in Molecular Biology*. 731, 105-114.

**Ur-Rahman S, Siddique M and Rasool MH. (2006).** Seroprevalence of *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* in ruminants and camel. *Small Ruminant Research*. 63, 28-31.

**Van Belkum A. (2007).** Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 49(1), 22-27.

**Van Kuppeveld FJ, Van der Logt JT, Angulo AF, Van Zoest MJ, Quint WG, Niesters HG, Galama JM, Melchers WJ. (1992).** Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Applied and Environmental Microbiology*. 58(8), 2606-2615.

**Van Kuppeveld FJ, Johansson KE, Galama JM, Kissing J, Bolske G, Hjelm E, Van der Logt JT, Melchers WJ. (1994).** 16S rRNA based polymerase chain reaction compared with culture and serological methods for

## Bibliografía

---

diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 13(5), 401-405.

**Vega-Orellana O, Poveda JB, Rosales RS, Bradbury JM, Poveda CG, Mederos-Iriarte LE, Tavío MM, Ramírez AS. (2017).** Comparison of different NAT assays for the detection of microorganisms belonging to the class *Mollicutes*. *BMC Veterinary Journal*. Aceptado.

**Vicca J, Stakenborg T, Maes D, Butaye P, Peeters J, de Kruif A, Haesebrouck F. (2003).** Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Veterinary Microbiology*. 97, 177-190.

**Vilei EM, Abdo EM, Nicolet J, Botelho A, Gonçalves R, Frey J. (2000).** Genomic and antigenic differences between the European and African/Australian clusters of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Microbiology*. 146, 477-486.

**Vilei E, Frey J. (2004).** Differential clustering of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC strains by PCR-REA of the *bgl* locus. *Veterinary Microbiology*. 100, 283-288.

**Vilei EM, Korczak BM, Frey J. (2006).** *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC can be grouped into a single subspecies. *Veterinary Research*. 37(6), 779-790.

**Volokhov DV, Joseph G, Liu SX, Ikonomi P, Anderson C, 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. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71, 680-698.

**Volokhov DV, Simonyan V, Davidson MK, Chizhikov VE. (2012).** 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 *Mycoplasmataceae*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Jan;62(1):515-28.

**Waites KB, Duffy LB, Bébéar CM, Matlow A, Talkington DF, Kenny GE, Totten PA, Bade DJ, Zheng X, Davidson MK, Shortridge VD, Watts JL, Brown SD. (2012).** Standardized methods and quality control limits for agar and broth microdilution susceptibility testing of *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis*, and *Ureaplasma urealyticum*. *Journal of Clinical Microbiology*, 50, 3542–3547.

**Wang RY, Shih JW, Weiss SH, Grandinetti T, Pierce PF, Lange M, Alter HJ, Wear DJ, Davies CL, Mayur RK, Lo SC. (1993).** *Mycoplasma penetrans* infection in male homosexuals with AIDS: high seroprevalence and association with Kaposi's sarcoma. *Clinical Infectious Diseases*. 17(4), 724-729.

**Wang Y, Stingl U, Anton-Erxleben F, Geisler S, Brune A, Zimmer M. (2004b).** "*Candidatus* Hepatoplasma crinochetorum," a new, stalk-forming lineage of *Mollicutes* colonizing the midgut glands of a terrestrial isopod. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(10), 6166-6172.

**Watts JL, Chengappa MM, Cole JR, Cooper JM, Inzana TJ, Plaunt MR, Shyrock TR, Thornsberry C, Walker RD, Wu CC. (1999).** Development of *in vitro* susceptibility testing criteria and quality control parameters for veterinary antimicrobial agents; Approved guideline, NCCLS document M37-A [ISBN 1-56238-369- 8], Vol. 19, No. 3.

**Weisburg WG, Tully JG, Rose DL, Petzel JP, Oyaizu H, Yang D, Mandelco L, Sechrest J, Lawrence TG, Van Etten J. (1989).** A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *Journal of Bacteriology*. 171(12), 6455-6467.

**Weislander A, Boyer MJ, Wróblewsky H. (1992).** Membrane protein structure. En: Maniloff J, McElhaney R, Finch L y Baseman J (Eds.). *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis*. Washington, DC: American Society for Microbiology, pp. 93-112.

**Wernery U, Kaaden OR. (1995).** *Infectious diseases of camelids*. Berlin, Germany: Blackwell Wissenschafts Verlag.

**Westberg J, Persson A, Holmberg A, Goesmann A, Lundeberg J, Johansson KE, Pettersson B, Uhlén M. (2004).** The genome sequence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC type strain PG1T, the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). *Genome Research*. 14(2), 221-227.

**Williams C, Wittler R. (1971).** Hydrolysis of Aesculin and Phosphatase Production by Members of the Order *Mycoplasmatales* Which Do Not Require Sterol. *International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology*. 21, 73-77.

*Bibliografía*

---

**Wilson MH, Collier AM. (1976).** Ultrastructural study of *Mycoplasma pneumoniae* in organ culture. Journal of Bacteriology. 125(1), 332-339

**Wise KS, Calcutt MJ, Foecking MF, Madupu R, DeBoy RT, Röske K, Hvinden ML, Martin TR, Durkin AS, Glass JI, Methé BA. (2012).** Complete genome sequences of *Mycoplasma leachii* strain PG50T and the pathogenic *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony biotype strain Gladysdale. Journal of Bacteriology. 194(16), 4448-4449.

**Woods L, Smith T. (1972).** Tetrazolium agar overlay in test for *Mycoplasma pneumoniae*. Journal of Applied Microbiology. 24(1), 148-149.

**Woose CR, Manioff J, Zablen LB. (1980).** Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. 77(1), 494-498.

**Woose CR. (1987).** Bacterial evolution. Microbiology Reviews. 51, 221-271.

**Wu C, Wu H, Ning Y, Wang J, Du X, Shen J. (2005).** Induction of macrolide resistance in *Mycoplasma gallisepticum* in vitro and its resistance-related mutations within domain V of 23S rRNA. FEMS Microbiology Letters. 247(2), 199-205.

**Yavari C, Ramírez AS, Dare CM, Bradbury JM. (2007).** Differentiation of strains of *Mycoplasma gallisepticum*. Abstracts of the 15th World Veterinary Poultry Association Congress, Beijing, China. 235.

**Yavari CA. (2010).** Studies on a *Mycoplasma gallisepticum*-like organism isolated from the Humboldt penguin (*Spheniscus humboldti*). Tesis Doctoral, University of Liverpool. Reino Unido.

**Yıldız K, Başalan M, Duru O, Gökpinar S. (2011).** Antiparasitic efficiency of *Artemisia absinthium* on *Toxocara cati* in naturally infected cats. Türkiye Parazitoloji Dergisi.35(1), 10-4.

**You XX, Zeng YH, Wu YM. (2006).** Interactions between mycoplasma lipid-associated membrane proteins and the host cells. Journal of Zhejiang University Science B. 7(5), 342-350.

**Ziv G, Levisohn SL, Bar-Moshe B, Bor A, Soback S. (1983).** Clinical pharmacology of tiamulin in ruminants. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics.* 6(1), 23-32.







**Tesis doctoral**

**Lidia Esther Mederos Iriarte**  
**2017**

**ESTUDIO DEL GEN DEL ARN RIBOSOMAL 23S  
DE MICOPLASMAS DE RUMIANTES Y SU RELACIÓN  
CON RESISTENCIAS A MACRÓLIDOS**



**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS  
DE GRAN CANARIA**



**Facultad de Veterinaria**  
Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

