



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

*Facultad de Estudios Superiores  
" Cuautitlán "*

**CULTIVO, AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE  
Mycoplasma hyopneumoniae DE PULMONES  
NEUMONICOS DE CERDO**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A**

**CARLOS PONCE HERNANDEZ**

**D I R E C T O R E S**

**M. V. Z. M. EN C. JOSE ABEL CIPRIAN CARRASCO**

**M. V. Z. TONATIUH ALEJANDRO CRUZ SANCHEZ**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

# I N D I C E

	PAGINA
RESUMEN	a
LISTA DE CUADROS	d
<b>I. INTRODUCCION</b>	
A) GENERALIDADES DE LA CLASE MOLLICUTES	1
B) CARACTERISTICAS BIOLOGICAS DE LOS MICOPLASMAS	
1) MEMBRANA PLASMATICA	5
2) METABOLISMO	7
3) BASES BIOQUIMICAS EN LA CARACTERIZACION DE -- LOS MICOPLASMAS	
a) PRUEBA DE DEPENDENCIA DE LOS ESTEROLES	14
b) PRUEBA DE DIGITONINA	15
c) PRUEBA DE FERMENTACION DE LOS CARBOHIDRATOS	16
d) PRUEBA DE REDUCCION DEL TETRAZOLIO	17
e) PRUEBA DE HIDROLISIS DE LA ARGININA	17
f) PRUEBA DE HIDROLISIS DE LA UREA	18
g) PRUEBA DE PRODUCCION DE PEROXIDO DE HIDROGENO	19
4) DIAGNOSTICO SEROLOGICO EN LA IDENTIFICACION -- DE LOS MICOPLASMAS	19
C) MICOPLASMAS INVOLUCRADOS EN LAS AFECCIONES -- RESPIRATORIAS DEL CERDO	
1. <u>Mycoplasma hyopneumoniae</u>	22
2. <u>Mycoplasma hyorhinis</u>	24

3. <u>Mycoplasma hyosynoviae</u>	25
4. <u>Mycoplasma flocculare</u>	26
5. <u>Acholeplasma granularum</u>	27
6. <u>Acholeplasma laidlawii</u>	28
7. <u>Acholeplasma axanthum</u>	28
II) OBJETIVOS	29
III) MATERIAL Y METODOS	30
IV) RESULTADOS	44
V) DISCUSION	53
VI) CONCLUSIONES	54
VII) BIBLIOGRAFIA	55

## LISTA DE CUADROS

CUADRO		PAGINA
1	<i>Taxonomía de la Clase Mollicutes</i>	4
2	<i>Lesiones macroscópicas</i>	47
3	<i>Aislamiento de micoplasmas</i>	48
4	<i>Determinación del género</i>	49
5	<i>Caracterización bioquímica de los - micoplasmas aislados en pulmón de - cerdo</i>	50
6	<i>Especies de micoplasmas aislados en pulmones de cerdo</i>	51
7	<i>Distribución de los micoplasmas ais- lados en los diferentes lóbulos</i>	52

## R E S U M E N

Una de las enfermedades respiratorias que afectan al cerdo es la "neumonía enzootica", la cual en México se ha trabajado arduamente para tratar de establecer su diagnóstico y así en un trabajo previo se detectó la presencia de M. hyopneumoniae mediante la prueba de inmunofluorescencia, por ello en el presente trabajo se realizó su aislamiento e identificación mediante los medios de cultivo, pruebas bioquímicas y serológicas recomendadas.

Se recolectaron 126 pulmones neumónicos y 52 pulmones normales a nivel de rastro, durante un período comprendido entre agosto de 1984 a marzo de 1985, dichas muestras fueron trabajadas en el laboratorio para su cultivo en los medios de Friis, de Yamamoto y F-10 modificado. Posteriormente se aislaron 61 micoplasmas y se identificaron mediante las pruebas bioquímicas y serológicas con los siguientes resultados: de pulmones neumónicos 31 (64.6%) y de pulmones normales 10 (77%) que correspondieron a M. hyorhinis, de pulmones normales 3 (33%) y de pulmones neumónicos 13 (27%) correspondieron a M. flocculare y tan solo 4 (8.4%) en pulmones neumónicos fueron de M. hyopneumoniae, el cual fue identificado mediante el empleo del antisero homólogo, mediante las pruebas de inhibición metabólica y del crecimiento. Se determinó así por primera vez en México el aislamiento de M. hyopneumoniae y así como el de M. flocculare.

## I) INTRODUCCION

### A) GENERALIDADES DE LA CLASE MOLLICUTES

Los micoplasmas se han considerados únicos en su género, ya que son de entre todos los microorganismos - los que van a presentar ciertas características físico-químicas, biológicas y una organización intracelular -- similar a la de las bacterias. Entre las diferencias -- que se pueden encontrar se tienen las siguientes: son -- extremadamente pequeños ya que miden entre 220 y 300 -- nm, no tienen pared celular pero en cambio poseen una -- simple membrana trilaminar lipoprotéica, poseen riboso- mas 70 S, un cromosoma que es circular, y en cuanto a -- otras propiedades que presentan serian: su filtrabili- dad, su tinción, su inhibición metabólica y de crecien- to por anticuerpos específicos, además de su resisten- cia a una gran variedad de antibióticos que afectan la -- síntesis de la pared celular (Razin, 1969, Maniloff, -- 1972).

Los micoplasmas al no tener una pared celular ver- dadera, solo presentan una membrana delgada, la cual -- por medio de estudios de microscopía electrónica se ha -- observado que es una estructura trilaminar lipoprotéica la cual mide aproximadamente 100 Å, variando de especie a especie, así por ejemplo en M. gallisepticum mide --- entre 110 y 120 Å y en A. laidlawii solo es de 70 a 80- Å (Cartensen y cols. 1971).

Los micoplasmas son muy pleomórficos y esta carac- terística se debe a la plasticidad que presentan, a la -- fase del ciclo de vida en que se encuentren y a la edad de los cultivos ya sean líquidos o sólidos; las formas- que se pueden observar son de: cocos, filamentos, globú

los y grandes. Las formas básicas son las de cocos y las de filamentos son tan solo una fase transitoria --- (Razin, 1969, Morowitz, 1972).

Los micoplasmas son los únicos microorganismos -- conocidos de menor tamaño que son capaces de formar una sola clona que mide aproximadamente 0.33 micras de diámetro. Se sabe que la gran mayoría de los micoplasmas -- se reproducen por fisión binaria, en donde una sola -- célula da lugar a la formación de dos células hijas y -- en otras especies que son filamentosas es probable que estas sean capaces de romperse en fragmentos de filamentos viables de células hijas (Maniloff y Morowitz, 1972)

Los acholeplasmas al igual que los micoplasmas -- son miembros de la Clase Mollicutes y entre ellos existen muchas semejanzas biológicas pero también hay ---- otras propiedades que los hacen diferentes, entre las -- principales características se tienen las siguientes: -- son capaces de crecer en medios libres de células, no -- son sensibles a la digitonina, pueden crecer a temperaturas bajas de 22 °C, un genoma que mide aproximadamente  $1.0 \times 10^9$  d., realizan la síntesis de ácidos grasos a partir de acetatos y se ha localizado en la membrana la presencia de actividad enzimática de la NADH oxidasa y otras propiedades que presentan es que son glicolíticos y aparentemente no hidrolizan la urea y la arginina. Se piensa además de que el sistema de transporte de azúcares es similar al de los micoplasmas fermentativos, -- en donde el fosfoenolpiruvato depende del sistema fosfo transferasa, tienen la capacidad de hidrolizar la esculina y la arbutina (Barile y Razin, 1979).

Resumiendo, los micoplasmas se encuentran clasificados taxónomicamente dentro de la Clase Mollicutes ---



(Cuadro 1) y las características que presentan son las siguientes:

a) Son los microorganismos de vida libre más pequeños que existen ya que son capaces de pasar por filtros de 220 a 450 nm.

b) No tienen pared celular debido a que son incapaces de sintetizar los siguientes ácidos: *N*-acetil murámico y diaminopimélico y solo presentan una membrana trilaminar lipoprotéica.

c) Son capaces de crecer en medios libres de células, cuando se cultivan en medio sólido desarrollan colonias típicas de "huevo estrellado" y en medio líquido se observan por medio de cierta turbidez o por ligeros cambios en el pH, no reversionen a bacterias como lo hacen las "formas L" cuando se retira la sustancia inductora.

d) Solo el género *Acholeplasma* no requiere de esteroides para crecer, los demás géneros sí lo requieren debido a la incapacidad que presentan para efectuar la síntesis y a diferencia de las bacterias y de las "formas L" lo requieren en la membrana.

Los micoplasmas que son patógenos tienen predilección por las superficies serosas como son: la cavidad torácica, la cavidad abdominal y las cavidades. Entre las enfermedades que causan se tienen las siguientes: en los cerdos artritis, serositis y neumonía, en ovinos bovinos y caprinos producen artritis, mastitis y neumonía, en los seres humanos la neumonía atípica primaria (Stalheim, 1976).

## Cuadro 1

---

 TAXONOMIA DE LA CLASE MOLLICUTES
 

---

- Clase : Mollicutes  
 Orden : Mycoplasmatales  
 Familia 1: Mycoplasmataceae  
     a: Requieren de esteroides para crecer.  
     b: Tamaño del genoma de  $5.0 \times 10^9$  d.  
     c: Dihidronicotinamida adenín dinucleótido ---  
         (NADH) oxidasa, se localiza en citoplasma.
- Género 1: Mycoplasma (Contiene aproximadamente 50 --  
     especies).  
     No hidroliza la urea.
- Género 2: Ureaplasma (Una sola especie con serotipos)  
     Hidroliza la urea.
- Familia 2: Acholeplasmataceae  
     a: No requiere de esteroides para crecer.  
     b: Tamaño del genoma de  $1.0 \times 10^9$  d.  
     c: NADH oxidasa, se localiza en membrana.
- Familia 3: Spiroplasmataceae  
     a: Organismos helicoidales durante una fase --  
         del crecimiento.  
     b: Requieren de esteroides para crecer.  
     c: Tamaño del genoma de  $1.0 \times 10^9$  d.  
     d: NADH oxidasa, se localiza en citoplasma.
- Género 1: Spiroplasma (Una sola especie)
- Géneros de afiliación incierta.  
     1: Thermoplasma (Una sola especie).  
         No requiere de esteroides para crecer.  
         Tamaño del genoma de  $1.0 \times 10^9$  d.

en el medio ambiente como: pH, fuerza iónica, presión osmótica que existan en él, pueden inducir alteraciones sobre la estructura trilaminar lipoproteica. Además también la permeabilidad de la membrana se encuentra sujeta a los cambios de temperatura, en donde los componentes lípidicos van a presentar diferentes estados de transición, de tal manera que a temperaturas altas existe una mayor fluidez ya que estos se van a encontrar en la fase de líquido cristalino y a bajas temperaturas los fosfolípidos se pueden compactar a la forma de gel y aún así permitir la fluidez y la permeabilidad de la membrana plasmática (Razin, 1967; Razin, 1969; Saito, 1977).

La gran mayoría del sistema enzimático y del sistema respiratorio de los micoplasmas se encuentra localizado sobre la membrana. En estudios realizados sobre las membranas han revelado un gran contenido de proteínas y es del 50 al 80% del peso seco total de la membrana (Pollack, 1967; Razin, 1969; Archer, 1962).

Muchas de las enzimas que participan en la síntesis de los lípidos de membrana se encuentran sobre la membrana plasmática, entre las cuales se pueden mencionar a las enzimas responsables de la síntesis de los fosfolípidos, glucolípidos y fosfoglicolípidos como serían: la acil CoA, alfa glicerol fosfato transferasa que es la precursora de los fosfolípidos, la acil CoA tioesterasa en la cual intervienen los ácidos grasos de cadena corta, mostrando una baja actividad en las especies de micoplasmas que se probaron y una gran actividad en las especies de acholeplasmas, lo que sugiere que tiene un papel regulador en la biosíntesis de ácidos grasos (Rotterm, 1967; Saito, 1977; Saito, 1978).

Otras de las enzimas que se localizan sobre la membrana de A. laidlawii es la NADH oxidasa y en algunos otros acholeplasmas y micoplasmas pues interviene en la transferencia de electrones en la cadena respiratoria, - en M. mycoides subespecie mycoides se encuentra en citoplasma, así como también la enzima adenosín trifosfatasa la cual actúa sobre el ATP y da como producto ADP y pirofosfato inorgánico, así mismo también hay enzimas - ribonucleasas y deoxiribonucleasas, una aminopeptidasa que actúa sobre los péptidos y da como producto final - aminoácidos (Saito, 1977).

## 2. METABOLISMO

Los micoplasmas tienen como característica general la de presentar vías metabólicas deficientes para la -- producción de energía, ya que consumen grandes cantidades de sustratos para lograr la producción de energía - cuando efectúan la síntesis de macromoléculas. En cierta forma el género Mycoplasma, en lo que se refiere a - la producción de ácido a partir de la fermentación de - la glucosa se puede clasificar en tres grupos (Lynn, -- 1967)!

- a) Los que fermentan carbohidratos y no requieren de esteroides.
- b) Los que fermentan carbohidratos y requieren esteroides.
- c) Los que no fermentan carbohidratos y requieren -- esteroides.

Entre los micoplasmas que comprenden el primer grupo se tienen varias cepas de A. laidlawii, las cuales - contienen pigmentos carotenoides; el segundo grupo --- incluye a casi todas las especies de micoplasmas que --

## I) INTRODUCCION

### A) GENERALIDADES DE LA CLASE MOLLICUTES

Los micoplasmas se han considerados únicos en su género, ya que son de entre todos los microorganismos - los que van a presentar ciertas características físico-químicas, biológicas y una organización intracelular -- similar a la de las bacterias. Entre las diferencias -- que se pueden encontrar se tienen las siguientes: son -- extremadamente pequeños ya que miden entre 220 y 300 -- nm, no tienen pared celular pero en cambio poseen una -- simple membrana trilaminar lipoprotéica, poseen ribosomas 70 S, un cromosoma que es circular, y en cuanto a -- otras propiedades que presentan serian: su filtrabilidad, su tinción, su inhibición metabólica y de crecimiento por anticuerpos específicos, además de su resistencia a una gran variedad de antibióticos que afectan la síntesis de la pared celular (Razin, 1969, Maniloff, -- 1972).

Los micoplasmas al no tener una pared celular verdadera, solo presentan una membrana delgada, la cual -- por medio de estudios de microscopía electrónica se ha observado que es una estructura trilaminar lipoprotéica la cual mide aproximadamente 100 Å, variando de especie a especie, así por ejemplo en M. gallisepticum mide --- entre 110 y 120 Å y en A. laidlawii solo es de 70 a 80- Å (Cartensen y cols. 1971).

Los micoplasmas son muy pleomórficos y esta característica se debe a la plasticidad que presentan, a la fase del ciclo de vida en que se encuentren y a la edad de los cultivos ya sean líquidos o sólidos; las formas que se pueden observar son de: cocos, filamentos, globú

los y grandes. Las formas básicas son las de cocos y las de filamentos son tan solo una fase transitoria (Razin, 1969, Korowitz, 1972).

Los micoplasmas son los únicos microorganismos conocidos de menor tamaño que son capaces de formar una sola clona que mide aproximadamente 0.33 micras de diámetro. Se sabe que la gran mayoría de los micoplasmas se reproducen por fisión binaria, en donde una sola célula da lugar a la formación de dos células hijas y en otras especies que son filamentosas es probable que estas sean capaces de romperse en fragmentos de filamentos viables de células hijas (Kantloff y Morowitz, 1972).

Los acholeplasmas al igual que los micoplasmas son miembros de la Clase Mollicutes y entre ellos existen muchas semejanzas biológicas pero también hay otras propiedades que los hacen diferentes, entre las principales características se tienen las siguientes: son capaces de crecer en medios libres de células, no son sensibles a la digitonina, pueden crecer a temperaturas bajas de 22 °C, un genoma que mide aproximadamente  $1.0 \times 10^9$  d., realizan la síntesis de ácidos grasos a partir de acetatos y se ha localizado en la membrana la presencia de actividad enzimática de la NADH oxidasa y otras propiedades que presentan es que son glicolíticos y aparentemente no hidrolizan la urea y la arginina. Se piensa además de que el sistema de transporte de azúcares es similar al de los micoplasmas fermentativos, en donde el fosfoenolpiruvato depende del sistema fosfo transferasa, tienen la capacidad de hidrolizar la esculina y la arbutina (Barille y Razin, 1979).

Resumiendo, los micoplasmas se encuentran clasificados taxónicamente dentro de la Clase Mollicutes

(Cuadro 1) y las características que presentan son las siguientes:

a) Son los microorganismos de vida libre más pequeños que existen ya que son capaces de pasar por filtros de 220 a 450 nm.

b) No tienen pared celular debido a que son incapaces de sintetizar los siguientes ácidos: *N*-acetil mirámico y diaminopímelico y solo presentan una membrana trilaminar lipoprotéica.

c) Son capaces de crecer en medios libres de células, cuando se cultivan en medio sólido desarrollan colonias típicas de "huevo estrellado" y en medio líquido se observan por medio de cierta turbidez o por ligeros cambios en el pH, no reuerten a bacterias como lo hacen las "formas L" cuando se retira la sustancia inductora.

d) Solo el género *Acholeplasma* no requiere de esteroides para crecer, los demás géneros si lo requieren debido a la incapacidad que presentan para efectuar la síntesis y a diferencia de las bacterias y de las "formas L" lo requieren en la membrana.

Los micoplasmas que son patógenos tienen predilección por las superficies serosas como son: la cavidad torácica, la cavidad abdominal y las cavidades. Entre las enfermedades que causan se tienen las siguientes: en los cerdos artritis, serositis y neumónica, en ovinos bovinos y caprinos producen artritis, mastitis y neumonía, en los seres humanos la neumonía atípica primaria (Stalheim, 1976).

## Cuadro 1

---

 TAXONOMIA DE LA CLASE MOLLICUTES
 

---

- Clase** : Mollicutes  
**Orden** : Mycoplasmatales  
**Familia 1:** Mycoplasmataceae  
 a: Requieren de esteroides para crecer.  
 b: Tamaño del genoma de  $5.0 \times 10^9$  d.  
 c: Dihidronicotinamida adenín dinucleótido --- (NADH) oxidasa, se localiza en citoplasma.  
**Género 1:** Mycoplasma (Contiene aproximadamente 50 -- especies).  
 No hidroliza la urea.  
**Género 2:** Ureaplasma (Una sola especie con serotipos)  
 Hidroliza la urea.  
**Familia 2:** Acholeplasmataceae  
 a: No requiere de esteroides para crecer.  
 b: Tamaño del genoma de  $1.0 \times 10^9$  d.  
 c: NADH oxidasa, se localiza en membrana.  
**Familia 3:** Spiroplasmataceae  
 a: Organismos helicoidales durante una fase -- del crecimiento.  
 b: Requieren de esteroides para crecer.  
 c: Tamaño del genoma de  $1.0 \times 10^9$  d.  
 d: NADH oxidasa, se localiza en citoplasma.  
**Género 1:** Spiroplasma (Una sola especie)  
**Géneros de afiliación incierta.**  
 1: Thermoplasma (Una sola especie).  
 No requiere de esteroides para crecer,  
 Tamaño del genoma de  $1.0 \times 10^9$  d.



2: *Anaeroplasma* (Dos especies)

Algunas cepas requieren de esteroides y otros.

(Tully, 1979).

B) CARACTERISTICAS BIOLÓGICAS DE LOS MICOPLASMAS

1. Membrana plasmática.

La membrana plasmática que envuelve a los micoplasmas, consiste principalmente de lípidos y de proteínas, que son las que le van a dar ciertas características -- como es la plasticidad y la capacidad de adoptar una -- serie de formas, así como la fluidez y su permeabilidad (Rotterm, 1967, Razin, 1969, Manilloff y Morowitz, --- 1972).

Los componentes lipídicos de la membrana dan lugar a una estructura flexible y de aspecto granuloso, ya -- que estos siempre están en constante movimiento. El con-- tenido de los lípidos totales es del 25 al 30% de peso-- seco y estos se dividen en tres clases: lípidos neutros como el colesterol y los ésteres de colesterol, glicolí-- pidos como el diagalactosildiglicérido y en lípidos po-- lares como el fosfatidilglicerol y el difosfatidilglice-- rol; los cuales van a determinar el grado de fluidez y-- de permeabilidad, así como las características propias-- de la membrana. Dependiendo del estado físico en que se encuentran los lípidos de la membrana estos se pueden -- ver afectados en su estructura química por las variacio-- nes de carga de grupos polares que se encuentran en la-- parte externa de la membrana, en donde pequeños cambios

en el medio ambiente como: pH, fuerza iónica, presión osmótica que existan en él, pueden inducir alteraciones sobre la estructura trilaminar lipoproteica. Además también la permeabilidad de la membrana se encuentra sujeta a los cambios de temperatura, en donde los componentes lípidicos van a presentar diferentes estados de transición, de tal manera que a temperaturas altas existe una mayor fluidez ya que estos se van a encontrar en la fase de líquido cristalino y a bajas temperaturas los fosfolípidos se pueden compactar a la forma de gel y aún así permitir la fluidez y la permeabilidad de la membrana plasmática (Razin, 1967; Razin, 1969; Saito, 1977).

La gran mayoría del sistema enzimático y del sistema respiratorio de los micoplasmas se encuentra localizado sobre la membrana. En estudios realizados sobre las membranas han revelado un gran contenido de proteínas y es del 50 al 80% del peso seco total de la membrana (Pollack, 1967; Razin, 1969; Archer, 1982).

Muchas de las enzimas que participan en la síntesis de los lípidos de membrana se encuentran sobre la membrana plasmática, entre las cuales se pueden mencionar a las enzimas responsables de la síntesis de los fosfolípidos, glucolípidos y fosfoglicolípidos como serían: la acil CoA, alfa glicerol fosfato transilasa que es la precursora de los fosfolípidos, la acil CoA tioesterasa en la cual intervienen los ácidos grasos de cadena corta, mostrando una baja actividad en las especies de micoplasmas que se probaron y una gran actividad en las especies de acholeplasmas, lo que sugiere que tiene un papel regulador en la biosíntesis de ácidos grasos (Rotterm, 1967; Saito, 1977; Saito, 1978).

Otras de las enzimas que se localizan sobre la membrana de A. laidlawii es la NADH oxidasa y en algunos otros acholeplasmas y micoplasmas pues interviene en la transferencia de electrones en la cadena respiratoria, - en M. mycoides subespecie mycoides se encuentra en citoplasma, así como también la enzima adenosín trifosfatasa la cual actúa sobre el ATP y da como producto ADP y pirofosfato inorgánico, así mismo también hay enzimas - ribonucleasas y deoxirribonucleasas, una aminopeptidasa que actúa sobre los péptidos y da como producto final - aminoácidos (Saito, 1977).

## 2. METABOLISMO

Los micoplasmas tienen como característica general la de presentar vías metabólicas deficientes para la -- producción de energía, ya que consumen grandes cantidades de sustratos para lograr la producción de energía - cuando efectúan la síntesis de macromoléculas. En cierta forma el género Mycoplasma, en lo que se refiere a - la producción de ácido a partir de la fermentación de - la glucosa se puede clasificar en tres grupos (Lynn, -- 1967)!

- a) Los que fermentan carbohidratos y no requieren de esteroides.
- b) Los que fermentan carbohidratos y requieren esteroides.
- c) Los que no fermentan carbohidratos y requieren -- esteroides.

Entre los micoplasmas que comprenden el primer grupo se tienen varias cepas de A. laidlawii, las cuales - contienen pigmentos carotenoides; el segundo grupo --- incluye a casi todas las especies de micoplasmas que --

afectan a las aves, ratas, corderos, cerdos etc., entre los que se mencionan son: M. mycoides, M. hyorhins, -- M. fermentans etc. y del tercer grupo a M. hominis tipo 1, M. salivarium (Smith, 1967).

Los micoplasmas que son fermentativos dan la producción de ácido a partir de la glucosa, maltosa, almidón, glucogéno y de otros azúcares; la sucrosa y la galactosa raramente son fermentadas y solo la realizan los micoplasmas que afectan a las aves como M. gallinarum, no se ha detectado la fermentación de lactosa, pentosas o de polioles (Smith, 1967).

Se ha demostrado en forma directa la presencia de enzimas en M. mycoides las cuales son las siguientes: - hexocinasas, aldolasas, que son capaces de oxidar a la glucosa-6-fosfato, fructosa-1-6-difosfato y que pertenecen a la vía metabólica de Embden-Meyerhoff. La maltosa es en forma aparente degradada hasta glucosa por mediación de una reacción hidrolítica o por mediación de una reacción de transglicosidación en presencia de una fosforilación inicial al principio del proceso. Los azúcares manosa y fructosa entran a la vía glicolítica por medio de sus intermediarios fosforilados. El glicerol entra a la vía metabólica por medio de una fosforilación inicial a L-alfa glicero-fosfato y después se oxida a L-gliceraldehido-3-fosfato, esta última reacción es irreversible de acuerdo a los requerimientos nutricionales de glicerol, el cual es utilizado en la síntesis de fosfatidos y de poliglicero-fosfatos de la membrana plasmática (Smith, 1967).

El piruvato que se forma por la vía metabólica de Embden-Meyerhoff se reduce a lactato por medio de una enzima deshidrogenasa, la cual requiere de dihidronic-

tinamida (NAD). En forma anaeróbica el piruvato sufre una reacción de dismutación y pasa a lactato y acetato, en donde el piruvato es oxidado por el sistema pirúvico oxidasa el cual requiere de fosfato inorgánico, CoA, -- ácido alfa-lipoico y cocarboxilasa (Rodwell, 1967).

La actividad de las enzimas cinasas se ha demostrado que se encuentran sobre la fracción soluble de la -- membrana de los micoplasmas y que son capaces de fosforilar a la fructosa, glucosa-1-fosfato, glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato. Otro tipo de cinasas que fosforilan a la glucosa, manosa y ribosa se encuentran asociadas con la fracción particulada de la membrana. La demostración experimental se realizó con una enzima --- llamada fosfofructocinasa, una aldolasa y NADP que se encuentra ligado a la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa así como un nucleótido de piridina que está ligado a la enzima glicerol fosfato deshidrogenasa para dar piruvato. El piruvato formado es oxidado hasta acetato y dióxido de carbono, la última reacción requiere de -- CoA, cocarboxilasa y de ácido alfa-lipoico, la acetoina que se forma se da en un rango de pH de 4 a 7 por la -- vía activa del gliceraldehido (Smith, 1967; Rodwell, -- 1967).

Se ha demostrado también la presencia de enzimas que pertenecen al sistema glicolítico como son: la --- triosefosfato deshidrogenasa y una aldolasa, así como -- una enzima láctico deshidrogenasa. La glicólisis solo -- da la producción de dos moles de ATP por mol de glucosa (Van Demark, 1967).

Se ha detectado la presencia de la vía hexamonofosfato en los micoplasmas cuando estos se incubaron y cultivaron con glucosa-1-C<sup>14</sup> y con glucosa-6-C<sup>14</sup>, en la --

cual se encontró una concentración elevada de  $CO_2$  con glucosa-1- $C^{14}$  y una concentración baja con glucosa-6- $C^{14}$ ; así mismo la demostración directa se realizó por medio de una enzima NADP específica para la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, una transcetolasa y una ribosa-5-fosfato, la acumulación de heptosa y de fructosa se lleva a cabo cuando la ribosa-5-fosfato se incuba con extractos crudos del micoplasma a probar. La presencia de acetato lábil seguido de la fermentación de la glucosa indica la presencia de una enzima dismutasa o pirúvico descarboxilasa (Smith, 1966; Rodwell, 1966; Lynn, 1966).

Las especies de micoplasmas no fermentativos tienen la capacidad de reducir los compuestos del tetrazolio cuando se incuban en forma anaeróbica. La reducción de los colorantes cuando la realizan estos microorganismos cuando se dejan en reposo y son incubados con lactato y con alcoholes monohídricos de cadena corta, se observa por el cambio de coloración en el medio sólido. Se observa una ligera reducción cuando se emplea glutamato, alfa cetoglutarato y formato pero no se observa ninguna con los intermediarios de la vía de Embden-Meyerhoff, del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, glicerol, aminocidos o pentosas. Cuando la reducción se efectúa en presencia de una ribosa y de una fructosa estos sigieren la presencia de la vía hexamono fosfato, aunque no se ha demostrado la presencia de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Smith, 1966).

En 1969, Lynn reporta que *M. arthritidis* y algunas otras especies de micoplasmas no fermentativos son capaces de efectuar la oxidación de ácidos grasos de cadena corta y con un consumo máximo de oxígeno con butirato y

caprilato. Se ha demostrado que extractos crudos de este agente que se han cultivado con butirato se encuentran presente la vía beta-oxidativa y se propone un ciclo en el cual se ve involucrada la enzima acetil CoA una cadena corta de CoA transferasa, la acil CoA deshidrogenasa, la enoil CoA hidratasa para dar la formación de acetatos (Saito, 1976; Saito, 1977).

Otro de los caminos metabólicos que utilizan los micoplasmas no fermentativos, es el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, ya que pueden llevar a cabo la oxidación de ciertos tipos de ácidos grasos de cadena corta para la obtención de energía, aunque no la usan en forma muy común. En estudios realizados en *M. hominis* O7 se ha encontrado que presenta todas las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos y las del ciclo del glioxilato (Pollack, 1979).

Se han realizado estudios en los micoplasmas no fermentativos para la obtención de energía mediante el uso de aminoácidos y así mismo como de única fuente de carbono y esta se realizó por medio de la desaminación fosforolítica de la glutamina, la cual requiere de ADP,  $Mg^{2+}$  y de pirofosfato, esta reacción da como producto final ácido glutámico (Pollack, 1979).

La arginina se ha utilizado también como fuente para la obtención de energía de fosfato de adenosín trifosfato (ATP), la cual se lleva a cabo por medio la enzima arginina dehidrolasa, el primer paso de esta reacción en la cual interviene la enzima arginina deiminasa para dar la formación de citrulina y de amoníaco a partir de arginina y de agua. El siguiente paso de la reacción es donde se efectúa la fosforilación de la citrulina y da lugar a la formación de ornitina y de fosfato -

de carbamoyl en presencia de ADP y  $Mg^{2+}$  y por medio de la enzima carbamoyl sintetasa es llevado hasta dar la formación de ATP, amoniaco y  $CO_2$  (Pollack, 1979, Mac Faddin, 1978).

La localización de las enzimas de la cadena respiratoria en los micoplasmas se ha asociado con la membrana o con una fracción específica de la misma, para lo cual se han realizado estudios en A. laidlawii para localizar la enzima NADH oxidasa y se ha detectado que se encuentra asociada con una fracción de la membrana. La presencia de la enzima quinona reductasa y de la ferricitianuro reductasa se han detectado en M. gallinarum 293 (Van Demark, 1967).

Los micoplasmas que son fermentativos tienen un sistema respiratorio que se caracteriza por que termina en una flavina a diferencia de otros micoplasmas que tienen de cadena o de sistema respiratorio. Esta caracterización se basa en gran parte en la presencia de flavinas y en la ausencia de citocromos. Los espectros de absorción obtenidos en preparaciones de A. laidlawii de la membrana obtenidas con pronasa para la obtención de flavinas reducidas y oxidadas se encuentran a 366 y 455 nm (Morowitz y Terry, 1979).

Las diaforasas son enzimas que intervienen en la cadena respiratoria y la función que tienen es la de servir como acopladores en la reducción de "aceptores artificiales de electrones" como son los colorantes, la detección se ha realizado por la reducción del azul de metileno y la oxidación de NADH, se ha visto además que son flavoproteínas. Se han utilizado diferentes tipos de colorantes como son los siguientes: el dicloroindofenol, el azul de tetrazolito, los cuales tienen la cap<sub>2</sub>



alidad de ser oxido-reductores para el dinucleotido de nicotinamida dinucleotido y de las deshidrogenasas. La presencia de la actividad de las enzimas diaforasas se ha usado para la detección e identificación de los micoplasmas así como la de sus anticuerpos correspondientes (Pollack, 1979).

El uso de ferricianuro como un aceptor artificial de electrones presenta una significancia especial, la cual se relaciona con la reducción y con la enzima NADH deshidrogenasa en el sistema de transporte de electrones en la fosforilación oxidativa. Esta actividad se ha reportado en M. gallisepticum 293, en M. mycoides, --- M. pneumoniae, M. capricolum y en A. laidlawii, cuando las condiciones de cultivo son aeróbicas y el funcionamiento es normal en la generación de energía por medio de la fosforilación oxidativa (Van Demark, 1967).

Las diferentes especies de micoplasmas poseen --- transportadores tipo heme, la respiración aeróbica y la fosforilación oxidativa pueden representar la presencia de un sistema más eficiente para la producción de energía que en las especies de micoplasmas que tienen la -- ufa respiratoria que se efectúa por medio de las flavinas (Van Demark, 1967; Pollack, 1979).

La presencia de las quinonas solo han sido reportadas en los micoplasmas y en los thermoplasmas, son auto oxidables y pueden actuar en forma directa o como un -- intermediario que va a ligar a los nucleotidos de piridina que han sido reducidos y con el oxígeno, como se -- ha observado en M. gallisepticum 293 y en M. arthritidis 07 en los cuales se ha detectado la presencia de la enzima menadiona reductasa (Rodwell, 1967).

Se ha reportado la presencia de citocromos en ----

M. arthritidis, el cual es un micoplasma no fermentativo, los diferentes espectros de absorción dan bandas en las cuales se observan las formas reducidas de los citocromos a 532, 565 y 429 nm para el tipo "b", a 465 nm para el tipo "a" y para el citocromo "c" es de 550 nm.- Los intentos para detectar la presencia de citocromos en los micoplasmas fermentativos como: M. mycoides, -- M. gallisepticum, M. neuralyticum y en A. laidlawii no han tenido el resultado que se esperaba ya que estos no se han detectado (Van Demark, 1967).

### 3) BASES BIOQUIMICAS EN LA CARACTERIZACION DE LOS -- MICOPLASMAS.

#### a) Prueba de dependencia de los esteroides.

Los micoplasmas son en forma particular especies de microorganismos que requieren de esteroides como por ejemplo el colesterol en cantidades elevadas, ya que no pueden crecer en los medios de cultivo si no se les adiciona ya que son incapaces de sintetizarlo. A diferencia de los acholeplasmata que no requieren de esteroides ya que son capaces de sintetizarlos y pueden crecer en medios de cultivo sin esteroides. En base a esta gran -- diferencia se pueden separar ambas especies, ya que los micoplasmas son sensibles a la digitonina y los acholeplasmata no lo son (Fritts, 1975; Stalheim, 1976).

La prueba de dependencia de los esteroides en el -- cultivo de los micoplasmas en medios sólidos o líquidos es un criterio que nos sirve para determinar a la familia que pertenece el microorganismo a probar si es ---- dependiente de los esteroides pertenecerá a la familia -- Mycoplasmataceae y sera de la familia Acholeplasmata---

ceae si no es dependiente de los esteroides (Friis, 1975 Stalheim, 1976).

i) Prueba de digitonina.

Para la realización de esta prueba se requiere de una solución alcohólica de digitonina al 1.5% estéril y de discos de papel filtro estériles, a los cuales se les agrega una gota de la solución y se coloca posteriormente sobre los cultivos sospechosos de micoplasmas a probar, los cuales han sido sembrados recientemente en medios de cultivo sólidos. El papel que desempeña la digitonina en esta prueba de sensibilidad, se debe a la formación de un complejo con el colesterol presente en el medio de cultivo. Este complejo se debe a una reacción de precipitación y se conoce como el digitónido del colesterol, siendo este un complejo molecular disociable, que está formado por cantidades equivalentes de ambos compuestos químicos. Una vez que se ha formado el digitónido por medio de un halo blanco alrededor del disco de papel filtro, ya no queda disponible el colesterol del medio y los microorganismos no pueden tomarlo del mismo para incorporarlo a sus membranas, en caso de que logran incorporar colesterol del medio, el digitónido se formara entonces sobre la membrana plasmática, provocando cambios estructurales y de cargas eléctricas sobre la bicapa lipídica por efecto estérico y del potencial eléctrico de la membrana, causando un incremento en la permeabilidad membranal y como consecuencia la lisis de la célula por la entrada de líquidos y iones del medio de cultivo (Razin, 1967; Stalheim, 1976).

b) Prueba de fermentación de los carbohidratos.

La prueba de fermentación de los carbohidratos nos sirve para determinar la capacidad que tienen los microorganismos para fermentar o degradar un carbohidrato -- determinado en un medio de cultivo líquido para dar la producción de ácido, entre los carbohidratos que se utilizan se tienen los siguientes: glucosa, fructosa, manosa, inositol, dulcitol etc.. Ya que la fermentación es un proceso metabólico de oxidoreducción anaeróbica, en el cual un sustrato orgánico sirve como el aceptor final de hidrógeno en lugar del oxígeno, los productos finales de la fermentación son ácidos y el más común es el ácido láctico. Sin embargo se obtienen otros productos finales que van a depender del tipo de fermentación que utilizan los microorganismos de acuerdo con sus --- requerimientos nutricionales y energéticos (Mac Faddin, 1978).

Para la prueba de fermentación de los carbohidratos se emplea el medio base en forma líquida, al cual solo se le agregan los azúcares correspondientes en una concentración del 1%, los azúcares utilizados son: glucosa, manosa, fructosa, inositol y dulcitol, el pH se ajusta a 7.4. Las muestras de micoplasmas a probar se inoculan en tubos estériles con el medio líquido con el azúcar correspondiente y se dejan en incubación durante 7 días, una coloración amarilla nos indica que el microorganismo fermenta los carbohidratos produciendo ácidos y sera negativa si no se observan cambios en la coloración del medio (Boughton, 1974; Stalheim, 1976).

c) Prueba de reducción del tetrazolio.

Esta prueba nos sirve para determinar si el micoplasma a probar es o no fermentativo, ya que los micoplasmas fermentativos no son capaces de reducir el colorante tetrazolio (cloruro de 2.3.5-trifenil tetrazolio) cuando esta prueba se efectúa en un medio sólido que contenga lactato, fructosa y alcoholes monohidricos de cadena corta y que se incuben en forma anaeróbica (Crawford, 1966; Boughton, 1974).

Para la realización de esta prueba se requiere de cultivos de micoplasmas que han sido cultivados en medios sólidos que no contengan rojo de fenol que contengan aproximadamente 200 colonias/cm<sup>2</sup>, se corta un trozo de agar y se coloca sobre placas de agar que contengan tetrazolio en una concentración del 0.03%, se sellan con parafilm y se incuban a 37 °C durante 7 días el resultado sera positivo si hay la formación de una mancha rosada cuando se retira el trozo de agar, la prueba sera negativa si no hay cambio en la coloración del medio (Boughton, 1974).

d) Prueba de hidrólisis de la arginina.

Esta prueba nos ayuda a medir la capacidad enzimática que tienen los micoplasmas para descarboxilar un aminoácido como la L-arginina en el grupo carboxilo para dar la formación de una amina o una diamina y anhídrido carbónico. La arginina es catabolizada a través de dos sistemas que pueden ocurrir simultáneamente o en forma separada, estos sistemas son: el de la arginina dehidrolasa y el de la arginina descarboxilasa para dar la formación de citrulina y de amoniaco (Mac Paddin, 1978).

Se prepara el medio basal en forma líquida y se le adiciona una solución de L-arginina al 1% y el pH se ajusta a 7.0, el medio se distribuye en tubos estériles y se inoculan las muestras de microorganismos a probar y se dejan en incubación a 37 °C por 7 días. La prueba sera positiva si el medio muestra alcalinización, ya que nos indica que estos agentes son capaces de hidrolizar el aminoácido y sera negativa si no se observa ningún cambio en el medio (Boughton, 1974; Stalheim, 1976)

e) Prueba de hidrólisis de la urea.

Esta prueba nos sirve para determinar la capacidad que tienen los microorganismos para desdoblar la urea y dar lugar a la formación de dos moléculas de amoníaco, ya que la urea en solución se hidroliza dando como producto final carbonato de amonio. La ureasa es una enzima muy importante en la descomposición de los compuestos orgánicos nitrogenados como son las amidas, ya que estas son hidrolizadas rápidamente, la enzima actúa sobre los enlaces C-N del compuesto orgánico con excepción de los que contienen enlaces péptidicos (Mac Fadden, 1978).

Para la realización de la prueba, se prepara el medio basal en forma líquida y se adiciona urea en solución al 1%, el pH se ajusta a 7.2, las muestras a probar se inoculan en los tubos con el medio estéril y se dejan en incubación hasta por una semana a 37 °C. La prueba sera positiva si el medio se torna alcalino y sera negativa si no hay cambio en la coloración del medio (Boughton, 1974; Stalheim, 1976).

f) Prueba de producción de peróxido de hidrógeno.

La producción de peróxido de hidrógeno ha sido --- implicada en la producción de lesiones en el tracto res- piratorio en algunas especies de micoplasmas. Esta prue- ba nos sirve para determinar si este agente es capaz de producirlo "in vitro" en medios de cultivo sólido, la - cantidad de peróxido de hidrógeno es proporcional a la- cantidad de células presentes en el momento de la prue- ba. Esta producción de peróxido se asocia con la oxida- ción aeróbica de NADH y que se incrementa en presen- cia de glucosa y se sugiere que las lesiones que causa se - debe a la producción en bajas cantidades y no son debi- das a la acumulación de grandes cantidades en los teji- dos. En la prueba se utilizan eritrocitos tipo O de --- humano y la presencia de la producción de peróxido se -- detecta por medio del daño que les causa mediante la -- oxidación de la hemoglobina o por la peroxidación de -- lípidos causando la lisis del eritrocito (Cohen, 1967; - Pijoan, 1967; Cohen, 1969; Whittlestone, 1972).

4) DIAGNOSTICO SEROLOGICO EN LA IDENTIFICACION DE LOS  
MICOPLASMAS

Los organismos clasificados en el orden de los --- Mycoplasmatales, son los microorganismos más pequeños - que existen, los cuales estan rodeados de una membrana- trilaminar lipoproteica y se ha propuesto que se encuen- tra involucrada en las reacciones inmunológicas, ya que estas células son inhibidas en su crecimiento y elimina- das por el antisuero homólogo. Esta reacción toma lugar en la superficie de la membrana, en donde los antígenos externos son, las proteínas de la membrana y en -----

*M. hominis* se han identificado y se han encontrado tres dos de ellas son relativamente lábiles al calor y el tercer componente es estable a 100 °C, en A. laiciawii se ha visto que estos componentes antigénicos son solubles en Tween-20 y aparentemente son externos por que sus anticuerpos homólogos pueden ser adsorbidos por células enteras aunque hay otros componentes que están dentro de la membrana y estos no quedan expuestos. También se considera que los lípidos de la membrana pueden actuar como sustancias antigénicas ya que son parte integral de la membrana, las fracciones lipídicas serológicamente activas que se han podido separar por medio de una columna de ácido sílico, se ha observado que contienen: glucosa, galactosa, glicolípidos como son los componentes diglicosil y triglicosil con residuos de glucosa y/o galactosa en las siguientes especies de microorganismos que se probaron: A. laiciawii, A. granularum, A. axanthum pero en muchas otras especies no tienen una actividad serológica importante como en M. gallisepticum y en M. huorhinis (Riggs, 1967, Williams, 1967; Kahane, 1980, Archer, 1982).

Se han desarrollado una serie de pruebas serológicas con la finalidad de identificar a las diferentes especies de micoplasmas que afectan a los cerdos y las más recomendables son: la prueba de inhibición metabólica y la prueba de inhibición del crecimiento. Ambas pruebas son muy similares ya que son esencialmente de neutralización, la cual se lleva a cabo por medio del antisuero homólogo, el cual la actividad inhibitoria se encuentra relacionada con la adsorción de los anticuerpos sobre los componentes antigénicos de la membrana que rodea a estos agentes, ocasionando una depresión del metabolismo y como consecuencia la muerte de la



célula. Las diferencias que se observan en estas pruebas en su realización, es que en la prueba de inhibición metabólica se realiza en medio líquido con sustratos como son: la glucosa, arginina, urea y tetrazolio, que dan como productos ácidos o básicos, los cuales cambian la coloración del medio con una concentración baja de antisuero con una cantidad fija de microorganismos a probar, en la prueba de inhibición del crecimiento se requiere de una concentración elevada de antisuero ya que los anticuerpos tienen que difundir a través del medio sólido (Wallace, 1964; Taylor-Robinson, 1965; Taylor-Robinson, 1969; Todd, 1973).

a) Prueba de inhibición metabólica.

La prueba de inhibición metabólica es una de las más confiables para la identificación de los micoplasmas, ya que es de gran sensibilidad. Para la realización de la prueba se requiere de cultivos de estos agentes que estén a una concentración de  $10^4$  unidades formadoras de colonias, se requiere además de los antisueños homólogos contra los micoplasmas a probar. La prueba se realiza en una placa de microtitulación estéril de 96 pozos a los cuales se les agrega una cantidad constante de antígenos con el medio de cultivo conteniendo un sustrato que puede ser glucosa, arginina, urea o y tetrazolio, el antisuero homólogo se adiciona a los pozos en diluciones seriadas de 1:2, se incuban a 37 °C por una semana, se revisan diariamente y el título de la prueba será aquella dilución más baja de antisuero en la cual se observa que hay cambio en la coloración del medio (Wallace, 1964; Taylor-Robinson, 1966; Gourlay, 1967; Taylor-Robinson, 1969).

b) Prueba de inhibición del crecimiento.

Para la realización de esta prueba se requiere de cultivos de los microorganismos a probar en medio sólido a los cuales se les coloca un sensidisco con el anti suero homólogo, se incuban a  $37^{\circ}\text{C}$  durante una semana, la prueba sera positiva si se observa un halo de inhibición de 3 a 5 mm y sera negativa si hay crecimiento --- alrededor del sensidisco (Stanbridge, 1967; Stalheim, - 1976).

c) MICOPLASMAS INVOLUCRADOS EN LAS AFECCIONES RESPIRATORIAS DEL CERDO.

1. Mycoplasma hyopneumoniae.

De todas las especies de micoplasmas que afectan - al cerdo, Mycoplasma hyopneumoniae es el más exigente - en el aspecto de los requerimientos nutricionales y --- ambientales, ya que en los medios en los cuales se cultiva deben de tener un alto contenido de esteroides y de glucosa, requiere además de una atmósfera húmeda que --- contenga  $\text{CO}_2$  del 5 al 10%. Es un microorganismo de crecimiento lento, pues tarda de 7 a 10 días, tiene un --- mejor crecimiento en medios líquidos que en medios sólidos, el pH óptimo para su desarrollo se da en un rango de 7.2 a 7.6. Cuando crece en medios sólidos son capaces de formar colonias de 0.5 mm de diámetro, no presentan la protuberancia central típica en otras especies - de micoplasmas, ya que son colonias de aspecto granuloso. Cuando este agente se fija con alcohol metílico y - se tiñe con Giemsa, se observan cocobacilos delgados de 0.1 a 0.2 micrómetros de diámetro o como pequeñas ramificaciones de 0.1 a 0.2 micrómetros de grosor, se mues-

tra además como bipolar, no es capaz de formar manchas ni película, es fermentativo ya que es capaz de producir ácido a partir de la fermentación de la glucosa, no produce peróxido de hidrógeno con la tinción de azul de metileno, no hidróliza la arginina ni la urea (Goodwin, 1967; Frits, 1969; Marley, 1971; Whittlestone 1979; Rose, 1979).

Este micoplasma afecta principalmente a los cerdos que tienen una edad de 3 a 10 semanas, aunque puede infectar a cerdos adultos. Los cerdos que están infectados eliminan al agente en sus secreciones respiratorias y los cerdos susceptibles se infectan al inhalar los aerosoles contaminados, el microorganismo es llevado entonces a las márgenes ventrales del pulmón y se establecen en el epitelio bronquial, las lesiones se desarrollan siguiendo la progresión del agente, produciendo una infección crónica con una alta morbilidad y baja mortalidad. Las lesiones graves se observan principalmente en los lóbulos apicales y cardíacos, los cuales presentan una coloración pardo-rojiza, hay además un agrandamiento de los nódulos linfáticos que drenan al pulmón. Los lóbulos están brillantes e inflamados, consistencia carnosa cuando se cortan y las vías respiratorias contienen un exudado blanco, mucoso y pegajoso (Stalheim, 1976; Etheridge, 1979; Armstrong, 1982, Goodwin, 1982).

Histológicamente las lesiones se caracterizan por dar una neumonía celular alveolar, hay acumulación de células mononucleares y de linfocitos, también hay una progresiva y persistente hiperplasia en los nódulos linfáticos del tejido peribronquial y un engrosamiento de las paredes alveolares (Whittlestone, 1979).

Otras características de la infección, son la presencia de una tos seca, un incremento en la temperatura corporal de 1 a 1.5 °C y probablemente uno de los aspectos más importantes es el retraso aparente en el crecimiento y la ganancia de peso como consecuencia de la baja conversión alimenticia. Así mismo se piensa que existe una interacción de M. hyopneumoniae con otros agentes infecciosos como son los virus y las bacterias en la producción de la "neumonía enzootica", entre los cuales se tienen a los Adenovirus, al virus de la influenza porcina, Parvovirus, virus de Aujeszky como los agentes virales, entre los agentes bacterianos están los siguientes: Pasteurella multocida y Bordetella bronchiseptica (Switzer, 1967; Friis, 1972; Whittlestone, 1979; Armstrong, 1982).

## 2. Mycoplasma hyorhinis.

El papel que tiene Mycoplasma hyorhinis dentro de la neumonía en los cerdos no es muy preciso, ya que es un habitante normal de la cavidad nasal en los lechones en donde es posible encontrarlo en grandes cantidades y además es factible encontrarlo asociado con otros agentes infecciosos como: los cuerpos de inclusión en la rinitis causada por Citomegalovirus o con Haemophilus parasuis en pulmones sospechosos de "neumonía enzootica" (Whittlestone, 1979).

Cuando M. hyorhinis se cultiva en medios sólidos la morfología que presentan las colonias son las formas "típicas de huevo estrellado" de 1 nm de diámetro y son convexas. También se puede observar por medio de la tinción de Giemsa, cuando se fija en alcohol metílico se -

observan cocobacilos de 0.3 a 0.6 micrómetros con un borde rizado o borroso, solo unos pocos anillos claros se pueden detectar en comparación con los numerosos bordes claros que son bipolares y las formas circulares que se observan en las preparaciones de M. hyopneumoniae (Frits, 1971; Gois, 1971; Baskerville, 1972).

La principal lesión asociada con este micoplasma es la de causar una poliartritis-poliserositis en cerdos de 3 a 10 semanas de edad y en cerdos adultos que se encuentran bajo stress, también se pueden localizar en cualquier neumonía preexistente. La infección crónica se encuentra en el tracto respiratorio alto, siendo el mejor medio en el cual el microorganismo se mantiene en la vida, se transmite a los cerdos jóvenes por medio de aerosoles o por contacto directo, tiene preferencia por las superficies serosas incluyendo la membrana sinovial. Cuando entra al sistema circulatorio produce una septicemia febril, seguida de poliserositis, las lesiones son características, en primer lugar se da la presencia de un exudado serofibrinoso sobre la membrana seronasal, hay fibrosis pleural y puede continuarse por medio de adherencias pericardiales y peritoneales, hay un incremento de líquido sinovial pasando de claro a turbio, el cual puede contener grandes cantidades de fibrina (Fotgieter, 1972; Duncan, 1973; Stalheim, 1976)

### 3. Mycoplasma hyosynoviae.

Otro comensal muy común de la cavidad nasal y de la faringe de los cerdos es Mycoplasma hyosynoviae, él es el agente causal de una artritis no supurativa en cerdos que tengan 10 semanas de edad. El reservorio

principal del micoplasma son los cerdos adultos, ya que persiste por largo tiempo en tonsilas y es excretado en las secreciones nasales y fáringeas (Potgieter, 1972; Ross, 1973; Whittlestone, 1979).

Las características principales de M. hyosynoviae son las siguientes: en medio líquido desarrolla una deposición granular, su crecimiento es estimulado por la mucina gástrica del cerdo, son capaces de hidrolizar la arginina y además reducen al tetrazolio y al azul de metileno, las cuales la realizan en menos de 48 horas. La observación microscópica nos muestra microorganismos típicos, los cuales tienen un diámetro de 0.3 a 0.6 micrometros, con la tinción de Giemsa se observan formas esféricas de 5 a 15 nm de diámetro, cuando se cultiva en medio sólido se pueden ver colonias en forma de "huevo estrellado" con un área central muy prominente (Baskerville, 1972; Whittlestone, 1979).

#### 4. Mycoplasma flocculare.

Se ha detectado la presencia de M. flocculare en pulmones neumónicos de cerdo, el cual se aisló por primera vez en 1972 en Dinamarca por Friis y en Inglaterra por Goodwin y Whittlestone. En el año de 1976 Friis realizó experimentos en cerdos de diferentes edades y encontró que se puede aislar de pulmones neumónicos y de la cavidad nasal. Es muy similar a M. hyopneumoniae en la exigencia de requerimientos nutricionales, produce ácidos lenta, no crece fácilmente en medios sólidos, morfológicamente es igual y además tiende a dar reacciones cruzadas en algunas pruebas serológicas (Friis, 1972; Whittlestone, 1979).

En forma experimental se han probado aerosoles los cuales contienen al micoplasma en lechones, los cuales al ser sacrificados, en 3 de 15 de ellos se encontró la presencia de pequeñas lesiones neumónicas en el árbol bronquial y en unos cuantos alveólos, los cuales presentaron una ligera acumulación de células mono y polinucleares, no mostraron lesiones graves en la cavidad nasal, pero en la mucosa se detectaron acumulaciones de mononucleares y cierto daño sobre la superficie epitelial, el papel que tiene *M. flocculare* dentro del complejo neumónico es incierto (Frits, 1973; Whittlestone, 1979).

#### 5. Acholeplasmas.

En la actualidad se desconoce el papel que desempeñan los acholeplasmas dentro de la "neumonía escóptica" del cerdo, ya que en algunas ocasiones se ha reportado su aislamiento, entre los cuales están los siguientes:

##### a) Acholeplasma granularum.

Se han reportado aislamientos de *A. granularum* en la cavidad nasal, de secreciones nasales, de pulmones neumónicos y de heces. La infección experimental de este agente en lechones por medio de la vía respiratoria no da una evidencia clara de ser patógeno, produce ácidos a partir de la glucosa, reduce al tetrazolito en condiciones anaeróbicas, es negativo a la prueba de la fosfatasa, no hidróliza la esculina pero sintetiza pigmentos carotenoides (Switzer, 1967; Whittlestone, 1979).

b) Acholeplasma laidlawii.

Se han reportado aislamientos de A. laidlawii en los cerdos, de la cavidad nasal, de pulmones neumónicos de vagina y de útero, de metritis puerperal. Pero no hay una clara evidencia de que la presencia de este agente con alguna infección o síndrome grave, así como no hay una evidencia clara de una respuesta serológica que se produzca cuando se inocula por vía intranasal a lechones, produce ácida a partir de la glucosa, no hidróliza la arginina ni la urea, ni produce manchas y película pero si reduce al tetrazolio (Cottew, 1979, Whittlestone, 1979).

c) Acholeplasma axanthum.

La patogenicidad de A. axanthum fue probada por Stipkovitz, por medio de una suspensión pulmonar por inoculación intranasal a cerdos, en los cuales se observó una neumonía amplia y una buena respuesta serológica un cultivo del agente que fue clonado produce lesiones menos graves, pero muy similares al de la suspensión pulmonar, aunque faltan más evidencias que comprueben si es o no patógeno natural del cerdo, este acholeplasma produce ácida a partir de la glucosa, no hidróliza la arginina ni a la urea, es capaz de reducir al tetrazolio en condiciones aeróbicas, no produce manchas y película, es capaz de hidrólizar la esculina (Gourlay, 1979; Whittlestone, 1979).



## II) OBJETIVOS

Debido a la necesidad de corroborar la presencia de Mycoplasma hyopneumoniae en pulmones sospechosos de "neumonía enzootica" en los cerdos del país, se planteó como objetivo principal de este trabajo, el de aislar e identificar a M. hyopneumoniae así como otros tipos de micoplasmas que estén involucrados.

Así mismo se han planteado una serie de objetivos particulares tendientes a cumplir con el principal:

1. Selección y colección de las muestras a nivel de rastro, de pulmones de cerdo con lesiones características de "neumonía enzootica".
2. Aislamiento e identificación de los micoplasmas -- encontrados en los pulmones neumónicos.
3. Determinación de un medio de cultivo por comparación de crecimiento para el cultivo y propagación de -- Mycoplasma hyopneumoniae.
4. Determinación del tipo de pruebas bioquímicas y -- serológicas que son las adecuadas para su identifica--- ción correspondiente.

### III) MATERIAL Y METODOS.

#### 1. Material.

a) Durante un periodo de 8 meses comprendido entre -- agosto de 1984 a marzo de 1985 se efectuaron visitas - semanales al Rastro de Cuautitlan Izcalli, con el objeto de coleccionar muestras de pulmones neumónicos sospechosos de "neumonía enzootica". Se coleccionaron 126 pulmones que presentaron áreas de consolidación rojiza de cerdos que manifestaron una deficiente ganancia de peso. Ademas se coleccionaron 52 pulmones que no presentaron cambios patológicos aparentes. Todas las muestras fueron - trabajadas inmediatamente y posteriormente conservadas en congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### b) Aislamiento.

Se emplearon los siguientes medios de cultivo líquidos y sólidos para el aislamiento de Mycoplasma --- hyopneumoniae como son el de Frits, de Yamamoto y el -- medio F-10 modificado, cuyas formulaciones se describen a continuación:

#### 1. Medio de Frits (Frits, 1971).

Infusión cerebro-corazón (Difco)	5.00 g
PPLO caldo (Difco)	5.00 g
Rojo de fenol (sol. 0.2%)	7.00 ml
Agua destilada	450.00 ml
Solución salina balanceada de Hank's	152.00 ml

Se ajustó el pH a 7.4 y se esterilizó en el auto-- clave a  $121^{\circ}\text{C}$ , a 15 lbs. por 15 minutos. Para el medio sólido se agregaron 0.9 g de Agar Noble (Difco).

En forma aséptica se adicionarán los siguientes --  
compuestos estériles:

Extracto de levadura	100.00 ml
Suero de caballo	200.00 ml
Penicilina G	800 000 UI

El medio líquido se distribuyó en tubos de rosca --  
con tapón de baquelita estériles y el medio sólido en --  
cajas de Petri estériles, se almacenarán en refrigera--  
ción hasta su uso.

Preparación de la solución salina balanceada de --  
Hank's, los compuestos se agregaron en el siguiente ---  
orden:

#### Solución Stock A

NaCl	80.00 g
KCl	4.00 g
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	1.00 g
MgCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O	1.00 g
Agua destilada	400.00 ml
CaCl <sub>2</sub>	1.40 g
Agua destilada hasta	500.00 ml

#### Solución Stock B

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -12H <sub>2</sub> O	1.50 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.60 g
Agua destilada hasta	500.00 ml

Al momento de su uso, 25 ml de la solución A se --  
mezcla con agua destilada hasta 400 ml, después se ---  
agregan 25 ml de la solución B y se ajora hasta 500 ml,  
se ajustó el pH con NaOH 1 N hasta 7.6 y se guardo en--

refrigeración hasta su uso.

2. Medio de Yamamoto (Yamamoto, 1971).

Se ha modificado esta formulación en varios de sus ingredientes y estos son los siguientes: se sustituyó - Brucella caldo por Todd Hewitt caldo, el suero de cerdo por el de caballo y no se adicionó el antisuero contra - Mycoplasma hyorhinitis, la formulación es la siguiente:

Todd Hewitt caldo (Difco)	5.80 g
Hidrolizado de lactoalbúmina (Difco)	2.00 g
Agua destilada	240.00 ml
Solución amortiguadora de fosfatos	500.00 ml
Rojo de fenol (sol. 0.4%)	5.00 ml
DNA	

Se ajustó el pH a 7.4 con NaOH y se esterilizó en el autoclave a 121 °C, 15 lbs., por 15 minutos. Para el medio sólido se agregaron 0.9 g de Agar Noble (Difco).

Se adicionaron en forma aséptica los siguientes -- componentes estériles:

Extracto de levadura	100.00 ml
Suero de caballo	200.00 ml
Meticilina	10.00 mg
Kanamicina	1.00 mcg

El medio líquido se distribuyó en tubos de rosca - con tapón de baquelita estériles y el medio sólido en - cajas de Petri estériles, ambos medios se guardaron en - refrigeración hasta su uso.

Preparación de la solución amortiguadora de fosfatos.

NaCl	8.00 g
KCl	0.40 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.06 g
Glucosa	10.00 g
Agua destilada	1000.00 ml

Se preparó al momento de su uso, se ajustó el pH a 7.4 con NaOH 1 N.

3. Medio F-10 modificado

Para la elaboración de este medio se empleó el medio F-10 (Gibco) en cuya formulación se encuentran los siguientes ingredientes en mg/ml.

CaCl <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O	33.29
CuSO <sub>4</sub> -5H <sub>2</sub> O	0.00249
FeSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	0.834
KCl	285.00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	83.00
MgSO <sub>4</sub> (anh.)	74.64
NaCl	7400.00
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	153.00
ZnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	0.0288
Glucosa	1100.00
Hipozantina	4.63
Acido lipolco	0.20
Rojo de fenol	1.20
Piruvato de sodio	100.00
Tiina	0.70
Mezcla de aminoácidos	

A este medio se le agregó 10 g de infusión cerebro corazón (Bioxón) por litro, se esterilizó por filtración (Millipore) y en forma aséptica se agregaron los siguientes componentes estériles: extracto de levadura en un 10%, suero de caballo en un 20%, penicilina G --- (800 000 UI). Se distribuyó en tubos de rosca con tapón de baquelita estériles, para el medio sólido se adicionó Agar Purificado (Bioxón) al 0.9% y se distribuyó en cajas de Petri estériles, ambos medios se guardaron en refrigeración hasta su uso.

c) Medios para caracterización bioquímica.

Se emplearon los siguientes medios para las pruebas bioquímicas en la caracterización de los micoplasmas.

1. Hidrólisis de la arginina (Boughton, 1974).

PPL0 caldo (Difco)	10.00 g
L-Arginina (Sigma)	5.00 g
Rojo de fenol (sol. 0.2%)	6.25 ml
Agua destilada	250.00 ml

Se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 1 N y se esterilizó por filtración (Millipore) y se agregaron asépticamente los siguientes compuestos estériles:

Suero de caballo	100.00 ml
Extracto de levadura	50.00 ml
Penicilina G	800 000 UI

El medio líquido se distribuyó en tubos de rosca con tapón de baquelita estériles y se almacenaron en refrigeración hasta su utilización.

## 2. Fermentación de los carbohidratos (Boughton, 1974)

Se utilizaron como base los medios líquidos de --- Friis y de Yamamoto, a los cuales se les adicionó asépticamente los siguientes azúcares estériles al 1%: glucosa, fructosa, manosa, inositol y dulcitol, se ajustó el pH a 7.2 y posteriormente en forma aséptica los --- siguientes compuestos estériles:

Suero de caballo	200.00 ml
Extracto de levadura	100.00 ml
Penicilina G	800 000 UI

Los medios líquidos mencionados se distribuyeron en tubos de rosca con tapón de baquelita estériles y se almacenaron en refrigeración hasta su uso.

## 3. Medio de urea (Boughton, 1974).

Se utilizaron los medios líquidos de Friis y de -- Yamamoto sin glucosa, a los cuales se les adicionó urea en solución al 1%, se ajustó el pH a 7.2 con NaOH 1 N y después se adicionó en forma aséptica los siguientes -- ingredientes estériles:

Suero de caballo	200.00 ml
Extracto de levadura	100.00 ml
Penicilina G	800 000 UI

Los medios se distribuyeron en tubos con tapón de rosca estériles, se almacenaron en refrigeración hasta su utilización.

#### 4. Dependencia de esteroides (Frits, 1975).

Se preparó una solución alcohólica de digitonina - al 1.5% y se esterilizó por filtración (Millipore) y se adicionó una gota de la solución sobre discos de papel-filtro estériles, se secaron a 37 °C y se almacenaron en refrigeración hasta su uso.

#### 5. Medio sólido de tetrazolio (Boughton, 1974)

Se utilizaron los medios sólidos de Frits y de Yamamoto a los cuales no se les adicionó glucosa ni rojo de fenol, preparándose de la siguiente manera:

PPLO caldo (Difco)	10.00 g
Agar Purificado (Bioxón)	9.00 g
Agua destilada	250.00 ml
Solución de fosfatos	500.00 ml

Se ajustó el pH a 7.8-8.0 con NaOH 1 N y se esterilizó por autoclave y posteriormente se agregaron los siguientes compuestos estériles en forma aséptica:

Suero de caballo	200.00 ml
Extracto de levadura	100.00 ml
Penicilina G	800 000 UI

El medio se distribuyó en cajas de Petri estériles y se almacenaron en refrigeración hasta su uso.



d) Pruebas serológicas.

1. Prueba de inhibición metabólica (Taylor-Robinson, 1966; Woode, 1973).

1) Se utilizaron los medios líquidos de Frits, de Yamamoto y F-10 modificado con glucosa para el cultivo de los micoplasmas a titular en la prueba de inhibición metabólica. Se preparó una suspensión de estos antígenos a  $10^4$  unidades formadoras de colonias.

2) Se utilizaron placas de microtitulación (Falcon) de 96 pozos estériles.

3) Se utilizó antisuero homólogo contra M. hyopneumoniae para su identificación en la prueba de inhibición metabólica, el cual fue proporcionado amablemente por el Dr. Ross del Medical Veterinary Research Institute, College of Veterinary Medicine, Iowa State University.

2. Prueba de inhibición del crecimiento (Wallace, 1964; Stanbridge, 1967).

1) Se utilizaron los medios sólidos de Frits, de Yamamoto y F-10 mod. en los cuales se sembraron los microorganismos a probar.

2) Se utilizaron discos de papel filtro estériles impregnados con antisuero contra M. hyopneumoniae.

3) Se utilizaron discos de papel filtro estériles con antisuero contra los siguientes acholeplasma:

A. laidlawii, A. granularum y A. axanthum.

Los antisueros contra los acholeplasma fueron proporcionados amablemente por el Dr. Ernd del Institute of Medical Microbiology, University of Aarhus, Denmark.

4i) Se utilizaron muestras de microorganismos a probar en los medios líquidos de Friis, de Yamamoto y F-10 mod con 4 días de incubación.

e) Soluciones.

Se prepararon las siguientes soluciones para la prueba de producción de hidrógeno.

1) Solución de azul de metileno.

Se preparó una solución de azul de metileno al 0.1% para la prueba de producción de peróxido de hidrógeno, en agua destilada, la solución se esterilizó por filtración (Millipore) y se almacenó en refrigeración hasta su utilización.

2i) Solución salina fosfatada.

Se preparó la siguiente solución salina fosfatada-cuya formulación es la siguiente:

NaCl	8.00 g
KCl	0.40 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	0.15 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.06 g
Agua destilada	1000.00 ml

La solución se esterilizó por filtración (Millipore) y se guardó en refrigeración hasta su uso.

f) Tinción de Dienes.

Esta tinción se empleó para teñir las colonias de micoplasmas en los medios sólidos y la formulación es la siguiente:

Azul de metileno	2.50 g
Azur II	1.25 g
Maltosa	10.00 g
Carbonato de sodio	0.25 g
Acido benzofco	0.20 g
Agua destilada	100.00 ml

Se mezclaron todos los ingredientes y se almacenó en refrigeración hasta su utilización.

## 2. Métodos.

### a) Aislamiento.

1) Se tomó el pulmón de cerdo con lesiones neumónicas y se esterilizó la parte exterior con una espatula al rojo vivo, se retiró el área quemada con pinzas y tijeras estériles.

2) Se cortó un trozo de pulmón de 2 g de peso aproximadamente y se colocó en un homogenizador (Tenbroeck) - estéril con medio de cultivo estéril (5 ml) y se homogenizó hasta formar una suspensión.

3) La suspensión se decantó en tubos de centrifuga -- estériles y se centrifugaron a 2000 rpm por 10 minutos.

4) Se tomaron 0.3 ml del sobrenadante y se efectuaron diluciones logarítmicas hasta  $10^{-4}$  en los medios de cultivo líquidos (de Friis, de Yamamoto y F-10 mod.) en -- tubos que contenían 2.7 ml., se incubaron a 37°C durante una semana y se revisaron diariamente para observar si no había contaminación en las muestras, los tubos -- contaminados se desecharon.

5) De los tubos inoculados no contaminados, se tomó -- un inóculo con el asa de platino y se sembró en los ---

medios sólidos (de Friis, de Yamamoto y F-10 mod.), --- estos subcultivos de las muestras originales se efectuaron cada tercer día. Los medios sólidos inoculados se incubaron a 37 °C con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante -- una semana.

6i) Los medios sólidos se revisaron diariamente y las muestras contaminadas se desecharon. En las muestras -- en que se sospecho que había crecimiento de micoplasmas estas fueron separadas de las demás para efectuar una serie de subcultivos con la finalidad de mantener estas cepas viables, las muestras de medio líquido sospechosas se congelaron a -70 °C.

7i) Para la identificación bioquímica y serológica se requiere de cultivos de micoplasmas que esten puros, ya que en la gran mayoría de los casos en los cultivos se pueden encontrar varias especies de micoplasmas y/o --- acholeplasmias. Para lo cual es necesario tener cultivos que solo contengan al microorganismo a probar, para lo cual es necesario efectuar una serie de clonaciones. -- Estas clonaciones se efectúan tomando una colonia del medio sólido con una espátula delgada con punta roma y pasarla a un medio líquido y dejarla en incubación por 3 o 4 días, una vez que ha pasado este tiempo se siembra en medio sólido nuevamente por medio de la técnica de dilución de colonias y se incuban, una vez que las colonias están separadas, se toma una de ellas de las que están más alejadas y se lleva a un medio líquido, este proceso de las clonaciones se repetirá tantas --- veces como sea necesario para obtener las colonias --- puras.

## 2. Caracterización bioquímica.

### a) Dependencia de esteroides.

Se sembraron los microorganismos a probar en los medios sólidos de Frits, de Yamamoto y F-10 mod. y se les colocó un sensidisco impregnado con digitonina y se incubaron a 37 °C con atmósfera de CO<sub>2</sub> durante 5 días.

Una zona de inhibición de 5 mm indica la dependencia de los esteroides.

### b) Prueba de hidrólisis de la arginina.

Los micoplasmas se sembraron en el medio líquido de arginina y se incubaron a 37 °C durante 5 días. Una reacción positiva se da cuando el medio se alcaliniza (color púrpura) indicando hidrólisis.

### c) Prueba de fermentación de los carbohidratos.

Los micoplasmas se sembraron en los medios líquidos de Frits, de Yamamoto con glucosa, fructosa, manosa inositol y dulcitol. Se incubaron a 37 °C durante 5 días un viré en la coloración del medio (amarilla) nos indica si la reacción es positiva.

### d) Prueba de hidrólisis de la urea.

Los micoplasmas se sembraron en los medios líquidos de Frits y de Yamamoto con urea. Se incubaron a 37 °C durante 5 días, una reacción positiva dará una coloración púrpura que nos indica que hay hidrólisis.

### e) Prueba de reducción del tetrazolio.

Se sembraron los micoplasmas a probar en el medio de tetrazolio sólido en anaerobiosis, se dejaron en ---

incubación a 37 °C durante una semana, Una coloración rosada nos indica que la prueba es positiva.

f) Prueba de producción de peróxido de hidrógeno.

Para la realización de esta prueba, se siembran los micoplasmas a probar en los medios sólidos correspondientes y se dejan en incubación durante 4 días, una vez que ha pasado este tiempo, se cortan trozos de agar que contengan un gran número de colonias de micoplasmas de 1 cm<sup>2</sup> y se colocan sobre un portaobjetos.

Por otro lado se utilizan eritrocitos tipo 0 de humano, los cuales se lavan 3 veces con solución salina fosfatada y se ajustan al 0.5%. Estos eritrocitos se mezclan con un volumen igual de azul de metileno diluido 1/10 en solución salina fosfatada. De esta mezcla se agregan dos gotas sobre el portaobjetos con las colonias de micoplasmas y al cabo de 5 minutos se observan al microscópio. Una reacción positiva se manifiesta cuando se tiñen los eritrocitos de color azul que rodean a las colonias de micoplasmas.

3. Pruebas serológicas.

a) Prueba de inhibición metabólica.

Los micoplasmas a probar se colocan en los pozos de la placa de microtitulación con las diluciones del antisuero homólogo contra M. hyopneumoniae y se incubaron a 37 °C durante una semana, el título de la prueba fue aquella dilución más baja en la que se observan cambios en la coloración del medio de cultivo.

b) *Prueba de inhibición del crecimiento.*

Se sembraron los micoplasmas a probar en los ---- medios de cultivo sólidos y se les colocaron sensibilizados con los antisueros homologos de M. hyopneumoniae y de los acholeplasmas. Una inhibición positiva se da --- cuando se da un halo de 3 a 5 mm de diámetro aproximadamente.

#### IV) RESULTADOS

##### 1. Lesiones macroscópicas.

De las muestras que se colectaron se observó que la gran mayoría de las lesiones se encontraban en los lóbulos anteriores del pulmón. La distribución de las lesiones en los diferentes lóbulos se muestran en el cuadro 2, las lesiones presentaban áreas de consolidación rojiza.

##### 2. Aislamientos.

Se aislaron un total de 61 micoplasmas de pulmones de cerdo normales y neumónicos, de los cuales 13 micoplasmas fueron de pulmones normales y 48 micoplasmas de pulmones neumónicos, como se observa en el cuadro 3.

##### 3. Determinación del género.

Los aislamientos de los microorganismos encontrados en los pulmones de los cerdos, se probaron para determinar el género al que pertenecen, si es a los micoplasmas o bien a los acholeplasma, por medio de las pruebas de digitonina y con los antisueros homólogos para identificar a los acholeplasma, los resultados se observan en el cuadro 4.

##### 4. Caracterización bioquímica y serológica.

Los resultados de la caracterización bioquímica y serológica se resumen en el cuadro 5.

5. En base a las pruebas bioquímicas y serológicas se determinaron las siguientes especies de micoplasmas aislados en pulmones de cerdo y se observan en el cuadro 6.



6. La distribución de las especies de micoplasmas --- aislados en los diferentes lóbulos de pulmones de cerdo normales y neumónicos se encuentran resumidos en el --- cuadro 7.

7. Medios de cultivo.




De los medios probados para el cultivo y la propagación de Mycoplasma hyopneumoniae, el que mostró ser - el más adecuado fue el medio F-10 mod. en comparación - con los medios de Frits y de Yamamoto.

## CUADRO 2 LESIONES MACROSCOPICAS

NUMERO DE  
PULMONES  
AFECTADOS

AREA DE  
CONSOLIDACION

LOBULOS CONECTADOS

79		APICAL DERECHO	No 56 % 44.50
		APICAL IZQUIERDO	No 23 % 18.20
30		CARDIACO DERECHO	No 15 % 12.00
		CARDIACO IZQUIERDO	No 15 % 12.00
17		DIAFRAGMATICO DERECHO	No 10 % 7.00
		DIAFRAGMATICO IZQUIERDO	No 7 % 5.40

**CUADRO 3**  
 **AISLAMIENTO DE MICOPLASMAS**

**PULMONES NORMALES**

**PULMONES NEUMONICOS**

<b>No.</b>	<b>13/52</b>	<b>No.</b>	<b>48/126</b>
<b>%</b>	<b>25</b>	<b>%</b>	<b>38.1</b>

**NUMERO Y PORCENTAJE DE AISLAMIENTOS (61) DE MICOPLASMAS REALIZADOS EN PULMONES NORMALES Y NEUMONICOS DE CERDO.**

**CUADRO 4**  
**DETERMINACION DEL GENERO**

TIPO DE PRUEBA	TOTAL DE AGENTES AISLADOS (61)	RESULTADO
DIGITONINA	+	MYCOPLASMA
PRUEBA DE INHIBICION DE CRECIMIENTO Y METABOLICA EMPLEANDO ANTISUEROS DE:  A <i>laidlawii</i>  A <i>granularum</i>  A <i>osanthum</i>	—  —  —	MYCOPLASMA

PRUEBAS PARA DETERMINAR EL GENERO BASADOS EN LA PRESENCIA O AUSENCIA DE ESTEROLES Y CONFIRMADA CON LA UTILIZACION DE ANTISUEROS DE --- ACHOLEPLAS QUE NO REQUIER ESTEROLES PARA SU CRECIMIENTO.

**CUADRO 5**  
**CARACTERIZACION BIOQUIMICA Y SEROLOGIA**

No. DE MYC	DIG	GLU	ARG	UREA	FRUC	MAN	INOS	DULC	TET	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	PIM +	PIC +	RESULTADO
41	+	+	-	-	+		+	+	-	+	o	o	Mycoplasma hyarhinis
16	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	o	o	Mycoplasma flocculare
4	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	Mycoplasma hyopneumoniae

DIG=Digitonina

GLUC=Glucosa

ARG=Arginina

FRUC=Fructosa

MAN=Manosa

INOS=Inositol

DULC=Dulcital

TET=Tetrazolio

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=Pérxido de  
hidrógeno

PIM=Prueba de inhibición metabólica

PIC=Prueba de inhibición del crecimiento

+ = Antisero homólogo

o = No se realizó la prueba

**CUADRO 6**  
**ESPECIES DE MICOPLASMAS AISLADOS**

PULMONES NORMALES

PULMONES NEUMONICOS

<i>Mycoplasma</i> <i>hyarhinis</i>	10/13	77 %	31/48	64.6 %
<i>Mycoplasma</i> <i>flocculare</i>	3/13	33 %	13/48	27.0
<i>Mycoplasma</i> <i>hypopneumonise</i>	—	—	4/48	8.4 %
<b>TOTAL</b>	13/13	100 %	48/48	100.0 %

**CUADRO 7**  
**DISTRIBUCION DE LOS MICOPLASMAS**  
 **AISLADOS EN LOS DIFERENTES LOBULOS**

No. DE AISL.	LOBULOS	Mycoplasma hyorhinis	Mycoplasma flocculare	Mycoplasma hyopneumoniae
6	APICAL DERECHO NORMAL	5	1	0
3	APICAL IZQ. NORMAL	2	1	0
2	CARDIACO DER. NORMAL	2	0	0
2	CARDIACO IZQ. NORMAL	1	1	0
0	DIAFRAGMATICO DER. NORMAL	0	0	0
0	DIAFRAGMATICO IZQ. NORMAL	0	0	0
20	APICAL DERECHO NEUMONICO	14	4	2
9	APICAL IZQ. NEUMONICO	5	3	1
13	CARDIACO DER. NEUMONICO	6	4	1
6	CARDIACO IZQ. NEUMONICO	4	2	0
0	DIAFRAGMATICO DER. NEUMONICO	0	0	0
0	DIAFRAGMATICO IZQ. NEUMONICO	0	0	0

## V) DISCUSION

De acuerdo a las observaciones esquematizadas con el sistema empleado por Goodwin (1971), Hannan y Bursh (1984), las lesiones neumónicas encontradas en los pulmones de cerdo colectadas en el Rastro de Cuautitlan -- Izcalli, en la época más fría del año, en cerdos que -- presentaban una baja de peso por el tamaño corporal com -- parado con los demás cerdos, fueron localizadas princi -- palmente en los lóbulos anteriores y se clasificaron -- como severas. En forma experimental Hannan y cols., --- (1984), Pfiffer y cols. (1984) y Underdahl y cols. ---- (1980) han demostrado que las lesiones detectadas se -- encuentran principalmente en los lóbulos anteriores de -- los pulmones neumónicos y además de que no se ven ---- influenciados por la edad de los cerdos, consecuente--- mente las lesiones que se detectaron en el presente --- trabajo son características de casos de "neumonía enzó tica" causada por micoplasmas.

Las lesiones neumónicas inducidas por inoculación de M. hyopneumoniae en pulmones de cerdo son caracte--- rísticas, sin embargo no son específicas para dar un -- diagnóstico positivo y solo se da como sugestivo o --- tentativo (Armstrong, 1982) y de ahí la necesidad de -- identificar al agente causal de la "neumonía enzótica" ya sea por medio de inmunofluorescencia como lo realizó Cruz S. Tonatiuth en 1983 o bien aislando y cultivando -- él o los micoplasmas que estén involucrados.

En el aislamiento de M. hyopneumoniae se presentan una serie de dificultades para su realización entre las cuales podemos mencionar: que es un microorganismo --- sumamente delicado y exigente en sus requerimientos ---



nutricionales y de aereación (microaerofílico), ya que en varias ocasiones se logró detectar la presencia de este agente en cultivos primarios sólidos, pero al intentar realizar su propagación en cultivos subsecuentes utilizando medios líquidos y sólidos se observó que no se adaptaba y no voluía a crecer, esto en base a las características morfológicas de M. hyopneumoniae. Por otro lado siempre se aisló un alto porcentaje de M. hyorhinis en casos sospechosos de "neumonía enzootica", esto quedo demostrado en este trabajo en el que se aisló el 65% de M. hyorhinis y tan solo el 8.4% de M. hyopneumoniae.

La identificación de los micoplasmas aislados se realizó en base a una serie de pruebas bioquímicas y serológicas aprobadas por el Subcomite de Taxonomía de los Mycoplasmatales (Subcommittee on the Taxonomy of Mycoplasmatales, 1977), sin embargo solo se identificó a M. hyopneumoniae con las pruebas de inhibición metabólica y del crecimiento con el antisuero homólogo, debido a que se carecía de los antisueros homólogos contra M. hyorhinis y M. flocculare. En el caso de M. hyorhinis su identificación se basó en la prueba de producción de peróxido, mientras que la de M. flocculare se realizó en base a que no fue inhibido con el antisuero homólogo de M. hyopneumoniae ya que bioquímicamente son similares.

De los medios de cultivo que se utilizaron en el presente trabajo, el medio de Friis el cual es utilizado ampliamente para realizar el aislamiento y propagación de M. hyopneumoniae resultó ser adecuado, sin embargo, debido a que en forma paralela se aisló también M. hyorhinis implica más trabajo para la purifica-

## VI) CONCLUSIONES

1. Se logró aislar e identificar por primera vez en México a Mycoplasma hyopneumoniae a partir de pulmones-neumónicos de cerdo que fueron colectados a nivel de rastro, los cuales presentaban lesiones características de "neumonía enzootica".
2. Se logró aislar a Mycoplasma flocculare por primera vez en México y su identificación se basó principalmente en las pruebas bioquímicas y en que no fue inhibido por el antisuero homólogo de M. hyopneumoniae.
3. Para lograr un mejor aislamiento de M. hyopneumoniae se recomienda el de adicionar a los medios de cultivo el antisuero de M. hyorhinis.
4. Se evaluarón tres medios de cultivo, dos de ellos el de Friis y el de Yamamoto se utilizaron solamente para el aislamiento primario de M. hyopneumoniae con buenos resultados y el tercero de ellos, el medio F-1C-modificado se utilizó solo para su propagación y mantenimiento.

ción (Frits, 1971). Por otro lado el medio de Yamamoto (1971), es en realidad un medio modificado de Frits, -- cuya modificación se basa en que se adiciona kanamicina y el antisuero de M. hyorhinis dando excelentes resultados, de hecho con este medio Yamamoto y Ogata encuentran un 97% de aislamientos de M. hyopneumoniae en ---- casos de "neumonía enzootica" mientras que en este trabajo se utilizó el medio de Yamamoto pero incompleto -- (solo se adicionó kanamicina y se empleó suero de caballo en vez de suero de cerdo) solo se obtuvieron pocos aislamientos. El medio F-10 modificado, es un medio --- ampliamente utilizado en los cultivos celulares y por lo tanto sumamente enriquecido, por lo que se empleó -- solamente para la propagación de los micoplasmas previamente aislados en los medios de Frits y de Yamamoto.

Se ha considerado de manera general que M. hyorhinis es el principal habitante natural del tracto respiratorio de los cerdos, especialmente de la cavidad ---- nasal, debido a que cuando se realiza el aislamiento de micoplasmas en pulmones de cerdo siempre se encuentra -- en un porcentaje muy elevado (Frits, 1971; Whittlestone 1979), se ha demostrado que existen algunas cepas que -- son patógenas y capaces de producir focos neumónicos en cerdos gnotobióticos principalmente en los lóbulos apicales y cardíacos (Gois, 1968; Ross, 1973) debido a la capacidad que tienen para producir peróxido de hidrógeno (Pijoan, 1974).

No se conoce actualmente el papel que tiene ---- M. flocculare en el tracto respiratorio de los cerdos -- ya que ha veces se ha considerado como un habitante normal (Frits, 1973) y otras veces se ha considerado como un agente patógeno (Whittlestone, 1979), produciendo --

## VII) BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Archer, D.B.; Rodwell, A.C. (1982). Membrane Proteins of Mycoplasma gallisepticum. Journal of Bacteriology. 151; 1598-1601.
- 2.- Armstrong, C.H. (1982). Neumonía por Micoplasmas - en Cerdos. International Swine Update. I. Jul.
- 3.- Barile, H.F., Razin, S. (1979). The Mycoplasmas, I Cell Biology. Academic Press.
- 4.- Baskerville, A.; Wright, C.L., Curran, W.L. (1972) The Ultrastructure of Mycoplasma hyorhinis in Both Culture. Rp. from: Research in Veterinary of Sciences, 13; 5; 497-499.
- 5.- Boughton, E., Thorns, C.J. (1974). Mycoplasma Lato ratory Handbook. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Central Veterinary Laboratory.
- 6.- Burch (1982) citado en: Thomas, P. The Influence - of Housing design and some management Systems on the Health of the Growing Pigs, particularly in relation to Pneumonia. Dec. 1984., 5; 4, 343-349.
- 7.- Cartensen (1971). citado en: The Mycoplasmas, I. - Cell Biology. Isolation and Characterization of Mycoplasma Membranes. Barile, H.F. and Razin, S. 1979., pag. 220., Academic Press.
- 8.- Cohen, G.; Somerson, H.L. (1967). Mycoplasma pneumoniae: Hydrogen Peroxide Secretion and its Possible role in Virulence. Annals of the New York Academy of Sciences, 143, Art. 1; 85-87.

- 9.- Cohen, G., Somerson, H.L. (1969). Glucosa-Dependent Secretion and Destruction of Hydrogen Peroxide by Mycoplasma pneumoniae. Journal of Bacteriology. 98, 2;- 547-551.
- 10.- Crawford, Y.E., Smith, F.F.; Panos, C.H.; Lynn, R.J (1969). A Microbial Enigma: Mycoplasma and Bacterial L-Forms. Parte 1. Mycoplasma of Human Derivation.; 43-44. The World Publishing Company.
- 11.- Cruz, S.A.T. (1983). Identificación de Mycoplasma hyopneumoniae a partir de Pulmones Neumónicos de Cerdo en México. Tesis Licenciatura. FES-C.-UNAM.
- 12.- Cottew, G.S. citado en: The Mycoplasmas II, The Human and Animal Mycoplasmas. Chapt. 3, Caprine-Ovine Mycoplasmas, pag- 125-126. Tully y Whitcomb. Academic Press. 1979.
- 13.- Duncan, J.R., Ross, R.F. (1973). Experimentally Induced Mycoplasma hyorhinis Arthritis of Swine: Pathologic Response to 26Th Post-Inoculation Week. Am. J. Vet. Res. 34, 3, 363-378.
- 14.- Etheridge, J.R., Cottew, G.S., Lloyd, L.C. (1979). Isolation of Mycoplasma hyopneumoniae from Lesions in Experimentally Infected Pigs. Australian Vet. Journal. 55, Aug.. 356-359.
- 15.- Friis, N.F. (1969). Mycoplasma suis pneumoniae Isolated in Denmark. Acta Vet. Scand. 10. 295-297.
- 16.- Friis, N.F. (1971). A Selective Medium for Mycoplasma suis pneumoniae. Acta Vet. Scand. 12, 454-456.

pequeños focos neumónicos de 2 a 4 mm en los lóbulos -- apical y cardíaco. Este agente es muy semejante a ---- M. hyopneumoniae, es exigente en sus requerimientos --- nutricionales y del medio ambiente, crece muy lentamente, morfológica y bioquímicamente son iguales pero se -- diferenciaron solamente por las pruebas de inhibición - metabólica y del crecimiento cuando se utilizaron los - antisueros homólogos (Rose y Tully, 1972; Friis, 1974).

Los aislamientos reportados de M. hyopneumoniae se han realizado principalmente en lechones o en cerdos -- destetados con una alta incidencia de "neumonía enzootica" (Yamamoto y Ogata, 1971; Friis, 1972; Pijoan, --- 1973; Tully y Whittcomb, 1979). En México debido a las -- dificultades que presenta su aislamiento solo se ha --- identificado por medio de la técnica de inmunofluores-- cencia (Cruz y cols., 1983) a partir de pulmones neu-- mónicos en los cuales los lóbulos más afectados fueron -- los apicales y cardíacos. En la actualidad en las refe-- rencias nacionales no se ha reportado el aislamiento de Mycoplasma hyopneumoniae y en este trabajo se reporta -- por primera vez su aislamiento y caracterización bioquí-- mica y serológicamente y así mismo se reporta la presen-- cia de Mycoplasma flocculare.

- 17.- Frits, N.F. (1971). Mycoplasma hyorhinis as a Causative Agent in Pneumonia in Pigs. Acta Vet. Scand. 12, -- 116-119.
- 18.- Frits, N.F. (1971). Mycoplasmas Cultivates from the Respiratory Tract of Danish Pigs. Acta Vet. Scand. 12, - 69-79.
- 19.- Frits, N.F. (1972). Serological Identification of a New Porcine Mycoplasma Species M. flocculare. Acta Vet. Scand. 13, 287-289.
- 20.- Frits, N.F. (1973). The Pathogenicity of Mycoplasma flocculare. Acta Vet. Scand. 14; 344-346.
- 21.- Frits, N.F. (1975). The SPS and Digitonin Test --- Applied to Porcine Mycoplasmas. Acta Vet. Scand. 16, --- 474-476.
- 22.- Gois, M., Valick, L. (1968). Mycoplasma hyorhinis a Causative agent of Pneumonia in Piglets infected Experimentally at several days of age. Docum. Vet. Brno. 7; -- 81-88.
- 23.- Gois, M., Pospisil, Z., Cerny, M., (1971) Production of Pneumonia after Intranasal Inoculation of Gnotobiotic Piglets with Three Strains of Mycoplasma hyorhinis. J. Comp. Path. 81, 401-410.
- 24.- Gois, M., Pospisil, M., Franz, J., Kuksa, F. (1971) A Study on the Pathogenicity and Immune Response in --- Gnotobiotic Piglets after Infection with Mycoplasma ---- hyorhinis. Acta Vet. Brno. Suppl. 2; 51-58.
- 25.- Goodwin, R.F., Pomeroy, A.P., Whittlestone, F. (1967). Characterisation of Mycoplasma suis-pneumoniae: A --- Mycoplasma Causin Enzootic Pneumonia of Pigs. J. Hyg. -- Camb. 65; 85-96.

- 26.- Goodwin, R.F. (1971). *Respiratory Diseases of Pigs* Vet. Rec. 89; 77-81.
- 27.- Goodwin, R.F. (1972). *Isolation of Mycoplasma suis pneumoniae from the nasal cavities and lungs of Pigs -- affected with Enzootic Pneumonia or Exposed to this --- Infection.* Rp. from: *Research in Veterinary Sciences.* - 13; 3; 262-267.
- 28.- Goodwin, R.F. (1982). *Neumonía Enzootica Porcina.* - *International Swine Update.* I, Jul.
- 29.- Guorlay, R.H., Domermuth, C.H. (1967). *Growth Inhibition and "Neutralisation" of Mycoplasma mycoides by Bovine Serum: I. Developmente of a liquid Test.* --- from: *Annals of the New York Sciences*, 143, Art. 1, --- 325-336.
- 30.- Gourlay, R.H. (1979).: citado en: *The Mycoplasmas-II, Human and Animal Mycoplasmas.* Chap. 3. *Bovine Mycoplasmas*, pag. 74. Tully and Whitcomb. Academic Press.
- 31.- Hannan, P.C., Banks, R.H., Bhogal, B.S., Smith, D.- (1984). *Reproductible Pneumonia in Gnotobiotic Piglets- Induced with Broth Culture of Mycoplasma hyopneumoniae and the of Animal Passage on Virulence.* *Research in --- Veterinary Science.* May. 153-163
- 32.- Jericho, K.W., Dane, S.H., Saunders, R.W. (1975).- *Pneumonia and Efficiency of Pig Production.* *Can. Vet. - Journal.* 16, 2. Feb. 44-49.
- 33.- Kenny, G.E. (1967) *Heat-Lability and Organic Sol- vent-Solubility of Mycoplasma Antigens.* Rp. from: ----- *Annals of the New York Academy of Sciences.* 143. Art. 1 676-681.



- 34.- Kenny, G.E. (1976). Serology of Mycoplasmic Infections. Rp. from: *Manual of Clinical Immunology*. American Society for Microbiology, Chap. 22, 357-362.
- 35.- Lynn citado en: *A Microbial Enigma: Mycoplasma and Bacterial L-Forms, The Physiology of Mycoplasmas*, pag. 122-127. Crawford, Y.E., Smith, F.P.. The World Publishing Company, 1966,
- 36.- Mac Paddin, J.F. (1978). Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica.- Edit. Médica Panamericana.
- 37.- Mantloff, J., Morowitz, H.J. (1972) Cell Biology of the Mycoplasmas. *Bacteriological Reviews*, 36, 3, --- 263-290.
- 38.- Marley, J., Spradbrow, P.B., Watt, D.A. (1971). -- The Isolation of Mycoplasmas from Porcine Pneumonia. -- *Australian Veterinary Journal*, 47, Aug., 375-378.
- 39.- Morowitz y Terry, citados en: *The Mycoplasmas, I, Cell Biology, Chap. 7, Respiratory Pathways and Energy-Yielding Mechanisms*, Pollack, J.D., Edit. Barile y --- Razin, 1979, Academic Press.
- 40.- Pfliffer, A., Ross, F., Tawar, F. (1984). Effect of Age on Susceptibility of Pigs to *Mycoplasma hyorhynchopneumoniae*. *A. J. Vet. Res.*, 50, 3, May., 478-481.
- 41.- Pi Joan, C., Roberts, D.H. (1973). Isolation of -- Mycoplasmas from Porcine Lungs, *Medical Laboratory --- Technology*. 30; 123-127.
- 42.- Pi Joan, C. (1974). Secretion of Hidrogen Peroxide- by some common Pig Mycoplasmas. *The Veterinary Record*.-

Sept. 7Th; 216-217.

43.- Pollack, M.E., Tourtellote, M.E., Halewaik, R.P. - (1967). Protein Synthesis in Mycoplasma. Rp. from: ---- Annals of the New York Acemy of Sciences. 143, Art. 1 - 130-138.

44.- Pollack, J.D. citado en: *The Mycoplasmas, I, Cell-Biology*, Chap. 7. Respiratory Pathways and Energy-Yielding Mechanisms, pag. 206-207. Barile y Razin, 1979, -- Academic Press.

45.- Potgieter, L.N., Ross, R.F., Frey, K.C. (1972). -- Chronological Development of *Mycoplasma hyorhinis* and *Mycoplasma hyosynoviae* Infections in Cultures of Swine-Synovial Cell Strain. Can. J. Comp. Path. 36, 2; 145---149.

46.- Razin, S., Rotterm, S. (1963). Fatty Acid Requirements of *Mycoplasma laidlawii*. J. Gen. Microbiol, 33, - 459-470.

47.- Razin, S., Rotterm, S. (1967). Electrophoretic --- patterns of Membrane Proteins of Mycoplasma. Journal of Bacteriology, 94, 2; 359-364.

48.- Razin, S. (1967). The Cell Membrane of Mycoplasma. Rp. from: Annals of the New York Academy of Sciences. -- 143, Art. 1, 115-129.

49.- Razin, S. (1969). Structure and Function in Myco-  
plasma. Rp. from: Annual Review of Microbiology, 23, -- 317- 356.

50.- Riggs, S., Sharp, J.T., Carpenter, R.R. (1967). --- Factors Involved in Growth Inhibition of Mycoplasma by - Immune Serum. Rp. from: Annals of the New York Academy-  
of Sciences, 143, Art. 1, 784-793.

- 51.- Roberts, D.H., Little, T.W.A. (1970). Serological Studies in Pigs with Mycoplasma hyopneumoniae. *J. Comp. Path.* 80, 211-220.
- 52.- Roberts, D.H., PiJoan, C. (1971). Identification of Mycoplasma hyorhinis. *Br. Vet. J.* 127; 582-586.
- 53.- Rodell, A.W. (1967). The Nutrition and Metabolism of Mycoplasma: Progress and Problems. *Sp. from: Annals of the New York Academy of Sciences.* 143, Art. 1, ---- 88-109.
- 54.- Rose, D.L., Tully, J.G., Wittler, R.G. (1979). --- Taxonomy of some Swine Mycoplasmas: Mycoplasma suis--- neumoniae Goodwin et al. 1965, A later objective synonym of Mycoplasma hyopneumoniae Haré and Switzer 1965, and the status of Mycoplasma flocculare Meyling and Friis - 1972. *International Journal of Systematic Bacteriology*- 29, 2; 83-91.
- 55.- Ross, R.F., Duncan, J.R. (1970). Mycoplasma hyosynoviae Arthritis of Swine. *J. Amer. Med. Assoc.* 157, 11-1515-1518.
- Ross, R.F. (1973). Predisposing Factors in Mycoplasma hyosynoviae Arthritis of Swine. *The Journal of Infectious Diseases.* 127; 84-86.
- 57.- Rotterm, S., Rasin, S. (1967) Electrophoretic ---- Patterns of Membrane Proteins of Mycoplasma. *Journal of Bacteriology.* 94, 2; 359-364.
- 58.- Saito, Y., Stilbus, J.R., McElhanev, R. (1976). -- Membrane Lipid Biosynthesis in Acholeplasma laidlawii E Elongation of Medium-and Long Chains Exogenous Fatty -- Acids in Growing Cells. *Journal of Bacteriology*, 132, 1 66-74.

- 59.- Saito, Y., Silvius, J.R., McElhaney, R. (1977). -- Membrane Lipid Biosynthesis in Acholeplasma laidlawii B De Novo Biosynthesis of Saturated Fatty Acids by Growing Cells. *Journal of Bacteriology*, 132, 2, 497-504.
- 60.- Smith, P.F. (1966) citado en: *Microbial Enigma: Mycoplasma and Bacterial L-Forms, Part 2, Physiology of Mycoplasma.*, pag. 123-130. Crawford, Y.E., Fanos, Ch. - 1966, The World Publishing Company.
- 61.- Smith, P.F. (1967). Comparative Lipid Biochemistry of Mycoplasma. Rp. frpm: *Annals of the New York Academy of Sciences.* 143, Art. 1, 139-151.
- 62.- Stalheim, O.H., Barber, T.L., Blackburn, E., Langford, E.V., Frey, M.L., Livingston, C.W. Jr. (1976). -- Laboratory Diagnosis of the Micoplasmosis in Food Animals. A Special Report of the Mycoplasmosis Committee - American Association of Veterinary Laboratory Diagnosis
- 63.- Stanbridge, E., Hayflick, L. (1967). Growth Inhibition Test for Identification of Mycoplasma Species Utilizing Dried Antiserum Impregnated Paper Disc. *Journal of Bacteriology*, 93, 4, 1392-1396.
- 64.- Subcommittee on The Taxonomy of Mycoplasmatales -- citado en *The Mycoplasmas*, I, Chap. 1, Classification and Taxonomy, Freundt and Edward, pag. 2.; Barile y Razin, 1979, Academic Press.
- 65.- Switzer, P.W. (1967) Swine Mycoplasmosis. Rp. ---- from: *Annals of the New York Academy of Sciences.* 143, Art. 1, 281-286.

- 66.- Taylor-Robinson, D., Purcell, R.H., Wong, B.C., -- Chanock, R.M. (1966). A Colour Test for the Measurement of Antibody to certain *Mycoplasma* Species Based upon the Inhibition of Acid Production. *J. Hyg.* 54, 91-104.
- 67.- Taylor-Robinson, D., Williams, M.H. (1967). Antigenicity of *Mycoplasma* Membranes. Rp. from: *Nature*, 215, - 973-974.
- 68.- Taylor-Robinson, D., Dinter, Z. (1968). Unexpected Serotypes of *Mycoplasma* Isolated from Figs. *J. Gen. --- Microbiol.* 53, 221-229.
- 69.- Taylor-Robinson, D., Berry, D.M. (1969). The Evaluation of the Metabolic Inhibition Technique for the Study of *Mycoplasma gallisepticum*. *J. Gen. of Microbiol* 55, 127-137.
- 70.- Tully, J.G., Whitcomb, R.F. (1979) *The Mycoplasmas II, Human and Animal Mycoplasmas*. Academic Press.
- 71.- Underdahl, V.R., Kennedy, G.A., Ramos, A.S. (1950) Duration of *Mycoplasma hyopneumoniae* Infection Gnotobiotic Pigs. *Can. Vet. J.* 21, Sept., 258-261.
- 72.- Van Demark, F.J. (1967). Respiratory Pathways in the *Mycoplasma*. Rp. from: *Annals of the New York Academy of Sciences*. 143, Art. 1, 77-84.
- 73.- Wallace, A. Clyde Jr. (1964). *Mycoplasma* Species - Identification Based upon Growth Inhibition by Specific Antisera. *J. Immunol.* 9, 958-965.
- 74.- Williams, M.H., Taylor-Robinson, D. (1967). Antigenicity of *Mycoplasma* Membrane. Rp. from: *Nature*. 215, - 5104; 973-974.

75.- Whittlestone, P. (1972). Pathogenicity of Mycoplasmas in Animals. Rp. from: Syposia of the Society for General Microbiology. No. XXII, Microbial Pathogenicity - in Man and Animals., pag. 217-250.

76.- Whittlestone, P. citado en: The Mycoplasmas, I, -- Chap. 4, Porcine Mycoplasmas, pag. 140-147. Tully and Whitcomb, 1979), Human and Animal Mycoplasmas. Academic Press.

77.- Woode, G.H., McMartin, D.A. (1973). Metabolic and Growth Inhibition of Mycoplasma gallisepticum by Antiserum. Journal of General Microbiology, 75, 43-50.

78.- Yamamoto, K., Ogata, M., Koshimizu, K. (1971). --- Selective Isolation of Mycoplasma suisneumonice from Pneumonic Lesions in Pigs. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart 11, 4; 168-169.