

## Detección de *Mollicutes* en leche de tanques procedentes de la provincia Zamora-Chinchipec, Ecuador

### Detection of *Mollicutes* in tank milk from Zamora-Chinchipec province, Ecuador

Natacha Ramírez-Sanmartín<sup>1</sup>, Luis Rodrigo-Saa<sup>2</sup>, María Irian Percedo<sup>3</sup>, Anisleidy Pérez-Castillo<sup>3</sup>, Evelyn Lobo-Rivero<sup>3</sup>✉

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Loja (UNL), Ecuador.

<sup>2</sup>Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL), Ecuador.

<sup>3</sup>Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

**RESUMEN:** Existen varias especies de *Mollicutes* que pueden producir mastitis. Entre estos agentes infecciosos se reconoce a *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma canadense*, *Mycoplasma californicum*, así como *Mycoplasma alkalences*, *Mycoplasma bovirhinis* y *Mycoplasma bovigenitalium*. El objetivo del presente estudio fue detectar la presencia de *Mollicutes* en leches de tanque procedentes de rebaños de la provincia Zamora-Chinchipec, Ecuador. Para la selección de los rebaños se realizó una zonificación, en bloques de 25 km<sup>2</sup>, de acuerdo a sus condiciones ecológicas (conglomerados). El número de rebaños para el estudio se determinó mediante el programa EpiData, para 95 % de confianza y 5 % de error. El muestreo se realizó entre mayo de 2015 y diciembre de 2016; se eligieron de forma aleatoria, los conglomerados de cada cantón, en los cuales se realizó el muestreo. En los rebaños seleccionados se colectó una muestra de leche (10 mL en tubo estéril) de cada tanque colector. Las muestras se analizaron mediante PCR con cebadores que amplifican un fragmento de 270 pb del ARNr 16S correspondiente a la clase *Mollicutes*. Además, las muestras se analizaron mediante PCR con cebadores específicos para detectar la presencia de *M. bovis*. De los 143 rebaños investigados, el 25,87 % resultó positivo a *Mollicutes* (37/143 muestras). Sin embargo, las 37 muestras positivas a *Mycoplasma* spp. resultaron negativas a *M. bovis*. Los resultados sugieren la presencia de otras especies de *Mollicutes* en los rebaños.

**Palabras clave:** *Mollicutes*, *Mycoplasma bovis*, mastitis, PCR.

**ABSTRACT:** There are several *Mollicutes* species that can produce mastitis. These infectious agents include *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma canadense*, *Mycoplasma californicum*, as well as *Mycoplasma alkalences*, *Mycoplasma bovirhinis* and *Mycoplasma bovigenitalium*. The objective of the present study was to detect the presence of *Mollicutes* in tank milk from herds in the Zamora-Chinchipec province, Ecuador. For the selection of the herds, a zoning was carried out in blocks of 25 km<sup>2</sup>, according to their ecological conditions (conglomerates). The number of herds for the study was determined by the EpiData program, for a 95 % confidence and a 5 % error. Sampling was carried out between May 2015 and December 2016, and the clusters of each canton to which the sampling was made were randomly chosen. In the selected herds, a milk sample (10 ml in sterile

✉ Autor para correspondencia: Evelyn Lobo-Rivero. E-mail: [elobo@censa.edu.cu](mailto:elobo@censa.edu.cu)

Recibido: 9/6/2017

Aceptado: 10/11/2017

tube) was collected from each collection tank. Samples were analyzed by PCR with 16S rRNA universal primers of the *Mollicutes* class. In addition, the samples were analyzed by PCR with specific primers to detect the presence of *M. bovis*. Of the 143 herds researched, 25.87 % tested positive to *Mollicutes* (37/143 samples). However, the 37 samples positive to *Mycoplasma* spp. were negative to *M. bovis*. The results suggest the presence of other *Mollicutes* species in the herds.

**Key words:** *Mollicutes*, *Mycoplasma bovis*, mastitis, PCR.

La mastitis es la principal enfermedad de la ganadería lechera a nivel mundial, debido a los efectos adversos que ocasiona sobre la producción y la calidad de la leche, los costos de tratamientos, las alteraciones en los procesos industriales y los daños a la salud del animal y del consumidor (1). En el caso del ganado bovino, se considera una enfermedad compleja, que ocurre producto a la interacción de varios factores: el sistema inmunitario de la vaca, el medio ambiente en que se encuentren los animales y la patogenicidad-virulencia del agente causal que intervenga en la infección de la glándula mamaria (2).

Los agentes causantes de mastitis son microorganismos que habitan en la ubre y sus alrededores. Se reportan, al menos, 137 especies de microorganismos de la glándula mamaria de bovinos afectados de mastitis, los cuales se clasifican en contagiosos, ambientales u oportunistas, de acuerdo con el origen de la infección y de su interrelación con otros agentes y/o factores (3). Entre los agentes infecciosos se reconoce a *Mycoplasma bovis* como un patógeno que causa mastitis crónica y su presencia se reporta asociada a esta patología en explotaciones intensivas de ganado lecheros (4). No obstante, existen trabajos que reportan la presencia de otras especies de micoplasmas como agentes etiológicos de mastitis; tal es el caso de *M. canadense* y *M. californicum* (5), así como *M. alkalences*, *M. bovirhinis* y *M. bovis genitalium* (6).

Entre las actividades a las que se dedican los agricultores de Ecuador está la crianza de ganado vacuno con fines de comercialización de leche y carne; sin embargo, uno de los problemas de esta crianza es la presentación de mastitis, que ocasiona la disminución de la calidad y cantidad de la leche y, con ello,

sensibles pérdidas económicas para los productores (7). Tanto el gobierno como los ministerios y asociaciones del país muestran interés por aumentar la producción y la calidad de la leche, pero no se realizan investigaciones científicas avaladas para avanzar en su diagnóstico, prevención y control (8). En tal sentido, solo se dispone de algunos reportes de estudios que muestran datos de prevalencia e incidencia de mastitis bovina en Cayambe, provincia Pichincha y El Chaco, provincia Napo, en los años 2012 y 2013, respectivamente (9).

También se conoce que los productores aplican tratamientos con diversos antimicrobianos para el control de la mastitis, pero la enfermedad no deja de ser un serio problema económico en sus rebaños, por lo que se asume que los productos y/o esquemas que utilizan no son los apropiados para los patógenos circulantes, como es el caso de los micoplasmas (10). En tal sentido es importante señalar que estos agentes presentan una resistencia intrínseca a determinados antimicrobianos, debido a la carencia de pared celular; tal es el caso de las penicilinas, los betalactámicos, los glucopéptidos, las polimixinas, la rifampicina y las sulfonamidas (11). Esto presupone un problema al elegir el antibiótico adecuado para el tratamiento de la mastitis, por eso se recomienda, regularmente, segregar y/o eliminar del rebaño las vacas afectadas por estos agentes (12).

A partir de lo señalado anteriormente, el objetivo del presente estudio fue detectar *Mollicutes* en leches de tanque procedentes de rebaños de la provincia Zamora-Chinchipec, Ecuador.

Para la selección de los rebaños se realizó una zonificación en bloques de 25 km<sup>2</sup>, de

acuerdo con sus condiciones ecológicas (conglomerados), según la metodología descrita por Puglla (13). El número de rebaños para el estudio se determinó mediante el programa EpiData, para un 95 % de confianza y 5 % de error. El muestreo se realizó entre mayo de 2015 y diciembre de 2016 y se eligieron, de forma aleatoria, los conglomerados de cada cantón en los cuales se realizó el muestreo.

En los rebaños seleccionados se colectó una muestra de leche (10 mL en tubo estéril) de cada tanque recolector. Las muestras se identificaron y se colocaron en neveras con refrigerantes; posteriormente se trasladaron al Laboratorio de Sanidad Animal y Zoonosis, de la Universidad Técnica Particular de Loja. Durante este proceso se cumplió con las medidas de bioseguridad descritas por Acuña (10).

Para la extracción del ADN se siguió el protocolo descrito por Rosseti *et al.* (14). Se centrifugaron 10 mL de leche a 3000 rpm por 10 minutos y se decantó el sobrenadante. Se tomaron 50 µL del sedimento acuoso y se adicionó a 200 µL de solución de lisis (0,1M Tris HCl, pH 8,5; 0,05 % Tween 20; 0,24 mg/mL de proteinasa K). Posteriormente, se incubó, en baño de agua, durante una hora a 60°C, pasado ese tiempo se volvió a incubar, esta vez a 95°C por 15 minutos. Las muestras de ADN se conservaron a -20°C hasta su posterior uso. Se trasladaron a MYCOLAB (Laboratorio de Referencia de la OIE para el Diagnóstico de Micoplasmas), perteneciente al Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Cuba.

Se utilizó el sistema de PCR descrito por Van Kuppeveld *et al.* (15) y la Farmacopea Europea (16). Se empleó la pareja de cebadores (Tabla 1), que amplifica un fragmento de 270 pb del ARNr 16S de la clase *Mollicutes* (15,16).

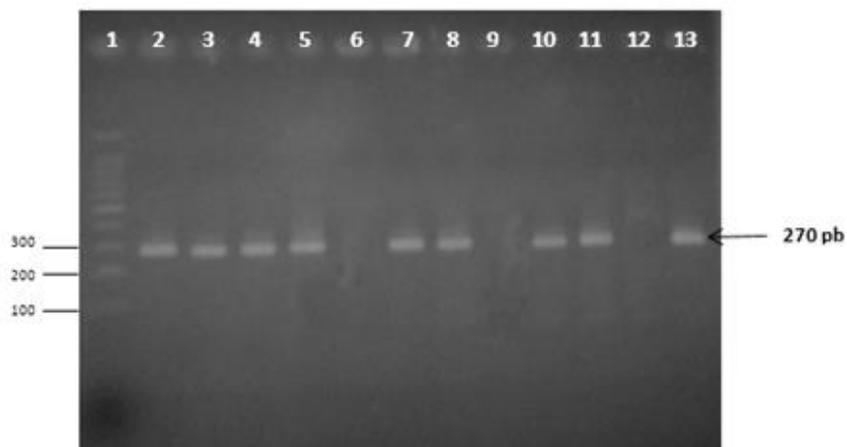
La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 25 µL, que contenía 3 µL del ADN de la muestra clínica, 20 pmoL de cada cebador, 1X Green Master Mix (Promega). La reacción de PCR se desarrolló en un Termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient, según el programa de amplificación descrito por Van Kuppeveld *et al.* (15): 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación a 60°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 30 segundos, y una extensión final de 72°C por 5 minutos.

Los productos se aplicaron en gel de agarosa al 2 % (v/v). Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Promega, Madison, EE.UU.). El gel se tiñó con Bromuro de Etidio (0,5 µg/mL) durante 15 minutos y los resultados se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta. El análisis estadístico de los resultados se realizó por el sistema de comparación de proporciones múltiples (17).

De los 143 rebaños investigados, en el 25.87 % se detectó la presencia de *Mollicutes* (37/143 muestras). La Figura 1 muestra el resultado del PCR para esta clase. Las muestras que resultaron positivas amplificaron un fragmento de 270 pb, el cual coincide con el obtenido por el control positivo y lo descrito para este ensayo (15,16).

**TABLA 1.** Secuencia nucleotídica de los cebadores utilizados en la amplificación de un fragmento del ARNr 16S de la clase *Mollicutes*. / *Nucleotide sequence of the primers used in the amplification of a fragment of the 16S rRNA of the Mollicutes class.*

Secuencia	Cebadores	Talla (pb)	Talla de producto
GPO-3: 5'-GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT-3'	sentido	25	270 pb
MGSO: 5'-TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC-3'	antisentido	27	



**FIGURA 1.** Electroforesis de los productos de PCR en gel de agarosa al 2 %. Línea 1: Patrón de peso molecular 100 pb (Promega); líneas 2-11: muestra en estudio; línea 12: control negativo PBS; línea 13: control positivo (ADN de *Mycoplasma arginini*). / *Electrophoresis of the PCR products in 2 % agarose gel. Line 1: 100 pb molecular weight marker (Promega); lines 2-11: sample in study; line 12: negative control PBS; line 13: positive control (Mycoplasma arginini DNA).*

La manipulación del material genético para el diagnóstico, o caracterización de un patógeno, siempre requiere de la preparación de la muestra, de tal forma que permita la exposición, la extracción o la purificación del ADN (18). Existen métodos descritos, no solo para micoplasmas y ureaplasmas, sino también para otros microorganismos basados en pasos de extracción con fenol cloroformo, combinación de choque térmico y centrifugación (19); los más novedosos se presentan en formatos de estuches comerciales, que pueden o no necesitar de equipamiento semiautomatizado o automatizado, de los que se obtienen muestras de ADN de alta pureza (20).

En el caso de la metodología que se utilizó en este trabajo (combinación de una solución de lisis, proteinasa K y choque térmico), permitió la obtención de ADN de micoplasmas a partir de muestras de leche. Este resultado coincide con lo que refieren algunos autores (6,14) sobre la utilización de este método para la obtención de un ADN que permite su utilización en ensayos de PCR. En tal sentido, las células de los micoplasmas, al carecer de pared celular presentan una membrana citoplasmática

trilaminar, rica en esteroides; esto le confiere una gran sensibilidad a las variaciones de presión osmótica, que afectan la composición de su membrana celular e inducen a la célula a un choque osmótico, lo que hace que ocurra la ruptura y que el ADN quede expuesto (14).

Por otra parte, la utilización de este método también propicia la eliminación de posibles sustancias inhibitoras presentes en la leche, tal es el caso del calcio, proteasas, nucleasas y ácidos grasos, así como restos de hemoglobina que pueden interferir en la reacción de PCR (21,22).

Los valores de positividad encontrados en este trabajo son inferiores a los reportados por Hirose *et al.* (6), quienes alcanzan 70 % de muestras positivas a micoplasmas a partir de muestras de leche procedentes de vacas con mastitis; semejante a lo reportado por Justice-Allen *et al.* (23), pues señalan 83 % de muestras de leche de tanque positivas a micoplasmas por PCR. La variación del por ciento puede ser atribuida al nivel de infección de los rebaños y al periodo de excreción del microorganismo en el momento de la toma de muestra, lo cual coincide con lo informado por Biddle *et al.* (24) y Wilson *et al.* (25).

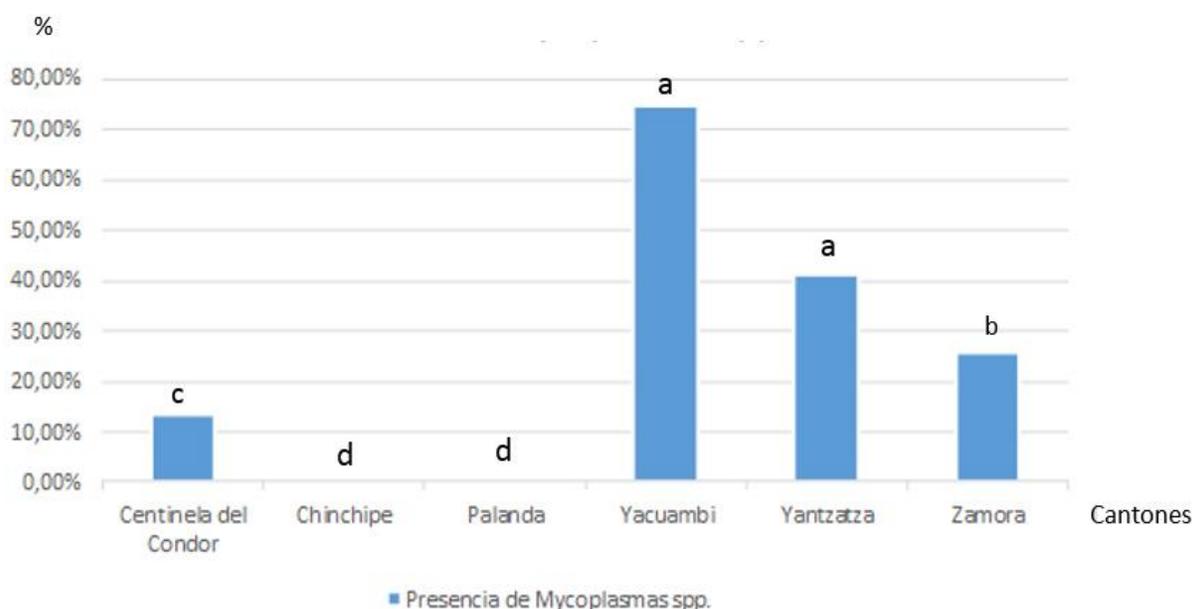
En la [figura 2](#) se observan los resultados del diagnóstico de *Mollicutes*, por PCR, en las muestras trabajadas teniendo en cuenta su origen. Como se puede observar, en las procedentes de los cantones Chinchipe y Palanda no se detectaron micoplasmas. Este resultado puede deberse a la no presencia del agente en esta zona por su ubicación geográfica y a la no práctica de intercambio de ganado; de igual manera, las condiciones higiénicas sanitarias en estas producciones son más controladas. Resultados similares se reportan por Baird *et al.* (26), quienes refieren que una fuente común de infección es la compra de vacas afectadas subclínicamente por mastitis.

Por otra parte, la alta positividad encontrada en el cantón Yacuambi puede estar asociada a las condiciones higiénico-sanitarias y al manejo de los animales, pues se conoce que las medidas de bioseguridad en hatos afectados por micoplasmas son imprescindibles para el control de los mismos (27).

El manejo de las vacas enfermas y recién paridas contribuye a la diseminación del

organismo. Estas no deben ser alojadas en los mismos corrales, ni ordeñadas con el mismo equipo y/o momento que las vacas enfermas, si no se tienen en cuenta las medidas de bioseguridad establecidas. La alimentación de los becerros con leche de desecho es otra fuente de transmisión, puede ocasionar neumonía, infecciones articulares e infecciones en los oídos (28).

Las 37 muestras positivas a *Mycoplasma* spp. resultaron negativas a *M. bovis*. Este resultado coincide con lo que reportan Andrade-Becerra *et al.* (29), quienes no detectaron *M. bovis* en muestras de leche en Colombia, en el Altiplano Boyacense. Resultados semejantes se describieron por Tamiozsoa *et al.* (30) al hallar solo *Mycoplasma canadense* y *Mycoplasma californicum* en muestras de leche de tanque; de igual manera, Hirose *et al.* (6) señalan 70 % de positividad para *Mycoplasma bovirhinis* en muestras de leche de tanque. Aunque se señala a *M. bovis* como la especie de micoplasmas más frecuente asociada a mastitis, en los últimos



Leyenda: letras desiguales  $p \leq 0,05$

**FIGURA 2.** Presencia de *Mollicutes* en muestras de tanque de leche procedentes de diferentes cantones de la provincia Zamora-Chinchipe. / *Presence of Mollicutes in milk tank samples from different cantons of Zamora-Chinchipe province.*

años se reportan otras especies como las mencionadas anteriormente, unidas a *Mycoplasma alkalescens* y *Mycoplasma bovis genitalium*, detectadas a partir de leche con mastitis (23).

Por tal motivo, se hace imprescindible continuar con la identificación de las especies de micoplasma presentes en las muestras que forman parte de este estudio.

## REFERENCIAS

1. Blowey R, Edmondson P. Mastitis control and dairy herds (Segundaed.). USA: Cab International. 2010.
2. Fuquay JW, Fox PF, McSweeney PL. Encyclopedia of Dairy Sciences 2<sup>nd</sup> Edition Online. Academic Press. 2011.
3. Keane B, Silverstein S, Wang Y, Thomas V. Reduced depth inversion illusions in schizophrenia are statespecific and occur for multiple object types and viewing conditions, UMDNJ, Piscataway, NJ 08854. 2008
4. Fox L, Kirk J, Britten A. *Mycoplasma* Mastitis: A Review of Transmission and Control. J Vet Med B. 2005;52:153-160.
5. Tamiozzo P, Estanguet A.A, Maito J, Tirante L, Pol M, Giraudo J.A. Detection of *Mycoplasma canadense* and *Mycoplasma californicum* in dairy cattle from Argentina. 2014;46(2):119-121.
6. Hirose K, Kawasaki Y, Kotani K, Tanaka A, Abiko K, Ogawa H. Detection of *Mycoplasma* in mastitis milk by PCR analysis and culture method. J Vet Med Sci. 2001;63:691-693.
7. INEC. Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua. ESPAC. 2014. Obtenido de [www.ecuadorencifras.gob.ec](http://www.ecuadorencifras.gob.ec)
8. Agencia ecuatoriana de. aseguramiento de la calidad del agro-AGROCALIDAD. 2013
9. Espinoza M, Mier J. Determinación de la prevalencia de mastitis mediante la prueba california mastitis test e identificación y antibiograma del agente causal en ganaderías del Cantón Chaco, Provincia Napo. (J. Mosquera, ed.) Quito. 2013. Recuperado el 2 de mayo de 2016, de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/1281/1/t-uce-0014-33.pdf>.
10. Acuña VL, Rivadeneira AP. Aislamiento, identificación y antibiograma de patógenos presentes en leche con mastitis en ganaderías bovinas de la provincia de Pichincha Ecuador: Escuela Politécnica del Ejército, Carrera de Ciencias Agropecuarias, 2008. Tesis (Título de Ingeniero Agropecuario). Disponible en: [http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2553/1/T-ESPE-IASA\\_i-20I-003435.pdf](http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2553/1/T-ESPE-IASA_i-20I-003435.pdf).
11. Sader H. Resistencia antimicrobiana en Latinoamérica. Rev Chil Infectol. 2002;19:5-13.
12. Siugzdaite J, Gabinaitiene A, Kerziene S. Susceptibility of *Mycoplasma bovis* field isolates to antimicrobial agents. Vet Med. 2012;(11):575-582.
13. Puglla Y. Determinación in vitro de la actividad microbiana de los fármacos utilizados en el tratamiento de la mastitis bovina en el cantón Centinela del Córdon de la provincia de Zamora Chinchipe. 2016. Trabajo de Titulación de Ingeniero Agropecuario, UTPL, Loja.
14. Rossetti B, Frey J, Pilo P. Direct detection of *Mycoplasma bovis* in milk and tissue samples by real-time PCR. Mol Cell Probes. 2010;24:321-323.
15. Van Kuppeveld FJM, Johansson KE, Galama JMD, Kissing J, Bölske G, van der Logt JTM, Melchers WJG. Detection of mycoplasma contamination in cell cultures by a mycoplasma group-specific PCR. Appl Environ Microbiol. 1998;60:149-152.
16. Farmacopea Europea. 2010.
17. Castillo DY, Miranda I. COMPAPROP: Sistema para comparación de proporciones múltiples. Rev Protección Veg. 2014;29(3):231-234.
18. Bashiruddin J. Extraction of DNA from *Mycoplasmas*. En: Methods in Molecular

- Biology. Vol. 104. Mycoplasma Protocols.1998;141-144.
19. Hernández Y. Desarrollo de un Sistema de Diagnóstico para la detección de micoplasmas en cultivos celulares y productos biofarmacéuticos. 2005. Tesis de Diploma. CENSA.
  20. Thurman KL, Cowart KC, Winchell JM. Comparison of nucleic acid extraction methods for the detection of *Mycoplasma pneumoniae*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2009;65:435-438.
  21. Rådström K, Sachse, Frey J. Pre-PCR Progresing of sampling in methods in molecular Biology: PCR detection of microbial pathogen. (Totowa, USA: Humana Press). 2003; pp.31-50.
  22. Naikare H, Bruno D, Mahapatra D, Reinisch A, Raleigh R, Sprowls R. Development and Evaluation of a Novel Taqman Real-Time PCR Assay for Rapid Detection of *Mycoplasma bovis*: Comparison of Assay Performance with a Conventional PCR Assay and Another Taqman Real-Time PCR Assay. 2015;16;2(1):32-42.
  23. Justice-Allen A, Trujillo J, Goodell G, Wilson D. Detection of multiple *Mycoplasma* species in bulk tank milk samples using real-time PCR and conventional culture and comparison of test sensitivities. J Dairy Sci. 201;94:3411-3419.
  24. Biddle MK, Fox LK, Hancock DD. Patterns of mycoplasmas heeding in the milk of dairy cows with intramammary mycoplasma infection. J Am Vet Med Assoc. 2003;223:1163-1166.
  25. Wilson DJ, Skirpstunas R. T, Trujillo J. D, Cavender KB, Bagley CV, Harding RL. Unusual history and initial clinical signs of *Mycoplasma bovis* mastitis and arthritis in first lactation cows in a closed commercial dairy herd. J Am Vet Med Assoc. 2007;230:1519-1523.
  26. Baird SC, Carman J, Dinsmore RP, Walker RL, Collins JK. Detection and identification of *Mycoplasma* from bovine mastitis infections using a nested polymerase chain reaction. J Vet Diagn Invest. 1999;11:432-435
  27. Ruegg PL, Tabone TJ. The Relationship Between Antibiotic Residue Violations and Somatic Cell Counts in Wisconsin Dairy Herds. 2000;83(12):2805-2809.
  28. Nicholas RA, Ayling RD. *Mycoplasma bovis*: Disease, diagnosis and control. Res Vet Sci. 2003;74:105-112.
  29. Andrade-Becerra RJ, Caro-Carvajal Z, Pulido-Medellín M, López-Cepeda M. Prevalencia de *Mycoplasma* spp., en fincas lecheras del Altiplano Boyacense, Colombia. Rev UDCA Act Div Cient. 2014;17(2):461-466.
  30. Tamiozsoa PJ, Estangueta AA, Maitoc J, Tirantec L, Polc M, Giraudoa J. Detection of *Mycoplasma canadense* and *Mycoplasma californicum* in dairy cattle from Argentina. Rev Argent Microbiol. 2014;6(2):119-121.