

## Trabajo Fin de Máster

### ***Mycoplasma ovipneumoniae* Real Time PCR**

aplicada al estudio de las neumonías atípicas de pequeños rumiantes

Autor

José Luis Arnal Bernal

Directores

Dra. Aleida Villa Espinosa

Dr. Raúl Carlos Mainar Jaime

Facultad de Veterinaria

Septiembre 2013



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN.</b>	6
<b>1.- INTRODUCCIÓN.</b>	
1.1.- Situación actual del sector de la explotación de la ganadería de pequeños rumiantes en España y Europa.	7
1.2.- Descripción del <i>Mycoplasma ovipneumoniae</i> .	9
1.3.- Patogenia.	10
1.4.- Influencia del ambiente en la presentación de enfermedades respiratorias en pequeños rumiantes.	11
1.5.- La neumonía atípica.	11
1.6.- La dificultad en el diagnóstico de <i>Mycoplasma ovipneumoniae</i> .	13
1.7.- Nueva técnica diagnóstica para la detección de <i>Mycoplasma ovipneumoniae</i> : Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR).	14
1.8.- Análisis filogenético de los mycoplasmas basado en el gen codificante para la fracción 16S del RNA ribosomal (rRNA).	17
<b>2.- OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO.</b>	20
<b>3.- MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	
3.1.- Muestras biológicas.	21
3.2.- Cultivo microbiológico.	22
3.2.1.- Aislamiento de mycoplasmas.	22
3.2.2.- Aislamiento de otras bacterias de interés.	22
3.3.- Aislamiento del ácido nucleico de las muestras y su control de calidad.	23
3.3.1.- Pretratamiento de las muestras procedentes de lavados traqueobronquiales.	23

3.3.2.- Pretratamiento de las muestras procedentes de pulmones.....	23
3.3.3.- Aislamiento del DNA. ....	24
3.3.4.- Control de calidad del DNA aislado. Análisis de concentración y pureza. ....	25
3.4.- PCR en tiempo real para la identificación de distintos mycoplasmas.....	26
3.4.1.- Ensayo qPCR de <i>Mycoplasma ovipneumoniae</i> . ....	29
3.4.2.- qPCR utilizadas para la investigación de otros mycoplasmas estudiados en este trabajo.....	29
3.5.- Análisis de datos estadísticos. ....	29
<b>4.- RESULTADOS.</b>	
4.1.- Aislamiento de mycoplasmas y cultivo microbiológico. ....	30
4.2.- Cultivo microbiológico.....	30
4.3.- Control de calidad de los ácidos nucleicos.....	31
4.4.- Validación del ensayo qPCR de <i>M. ovipneumoniae</i> . ....	31
4.5.- Validación del ensayo qPCR de <i>M. ovipneumoniae</i> con muestras clínicas. ....	34
<b>5.- DISCUSIÓN.....</b>	36
<b>6.- CONCLUSIONES.....</b>	40
<b>7.- BIBLIOGRAFÍA.....</b>	48
 <b>Anexo I</b> , situación de los cebadores directo, reverso y sonda en el gen 16S rRNA del genoma de una cepa de <i>M. ovipneumoniae</i> . ....	42
<b>Anexo II</b> , tabla resumida de datos obtenidos.....	43
<b>Anexo III</b> , pruebas bioquímicas para la identificación de los aislamientos microbiológicos. ....	47

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Imagen de microscopía electrónica de <i>Mycoplasma</i> spp. ....	8
Figura 2. Cultivo de <i>Mycoplasma</i> spp. ....	13
Figura 3. Oligo interno. ....	15
Figura 4. Clasificación filogenética de los mycoplasmas en función de la secuenciación del gen 16S rRNA. ....	18
Figura 5. Distribución geográfica del origen de los casos analizados. ....	21
Figura 6. Extractor automático de ácidos nucleicos. ....	24
Figura 7. Espectros de emisión en moléculas utilizadas para qPCR. ....	26
Figura 8. Plásmido utilizado para clonación de pMov. ....	26
Figura 9. Cultivo e identificación de <i>M. ovipneumoniae</i> . ....	30
Figura 10. Ensayo dúplex de <i>M. ovipneumoniae</i> y control endógeno. ....	31
Figura 11. qPCR para <i>M. ovipneumoniae</i> , curva estándar. ....	32
Figura 12. qPCR para <i>M. ovipneumoniae</i> , vista exponencial del gráfico de amplificación. ....	32
Figura 13. qPCR para <i>M. ovipneumoniae</i> , estudio de precisión. ....	33
Figura 14. Coeficientes de variación de las distintas diluciones decimales de pMov. ....	33
 Tabla I. Programa térmico de la reacción de qPCR. ....	 27
Tabla II. Cepas autóctonas de <i>M. ovipneumoniae</i> . ....	27
Tabla III. Panel de especificidad. ....	28
Tabla IV. Resultados del aislamiento microbiológico. ....	30
Tabla V. Presencia de otros mycoplasmas en las muestras positivas a <i>M. ovipneumoniae</i> . ....	34
Tabla VI. Presencia de bacterias de interés en las muestras positivas a <i>M. ovipneumoniae</i> . ....	35
Tabla VII. Resultados de coinfección cuando se investiga <i>M. ovipneumoniae</i> por cultivo microbiológico. ....	35
Tabla VIII. Resultados de coinfección cuando se investiga <i>M. ovipneumoniae</i> por qPCR. ....	35

## **RESUMEN**

*Mycoplasma ovipneumoniae* es el agente primario de la neumonía atípica de los pequeños rumiantes, una enfermedad en la que participa simultáneamente con *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* o *Bibersteinia trehalosi*. El aislamiento microbiológico de *M. ovipneumoniae* es lento, tedioso y, en ocasiones, no obtiene resultados concluyentes por la dificultad en la interpretación de las pruebas bioquímicas.

Este estudio discute el desarrollo y evaluación de una PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de *M. ovipneumoniae* y su relevancia en el diagnóstico de las neumonías atípicas en ganado ovino y caprino.

Para ello se diseñaron cebadores y sonda que reconocen específicamente una región del gen que codifica la subunidad 16S del RNA ribosomal. Un fragmento de este gen fue clonado para usarlo como control positivo y cuantificar la reacción. Un panel de 10 cepas referenciadas de *M. ovipneumoniae* y otros 32 microorganismos donde se incluían otras 4 especies de mycoplasma fueron evaluados.

Se estudiaron 123 casos clínicos de procesos respiratorios de ovejas y cabras mediante técnicas moleculares y microbiológicas. La qPCR resultó específica y obtuvo una sensibilidad diagnóstica 3 veces superior al aislamiento microbiológico. Finalmente se encontraron un 18% de casos que podrían sugerir, dada su etiología, una neumonía atípica.

Este ensayo se mostró sensible, específico y reproducible por lo que sugerimos su utilización como una herramienta útil en el diagnóstico de rutina de las neumonías de los pequeños rumiantes.

## **1.- INTRODUCCIÓN.**

### **1.1.- Situación actual del sector de la explotación de la ganadería de pequeños rumiantes en España y Europa.**

Para España el sector de pequeños rumiantes, ovino y caprino, cobra una relevancia especial. Este tipo de ganadería, con extensa tradición en nuestro país, cuenta con una filosofía de explotación y rendimientos diferente al resto de especies de abasto más intensivas como son el porcino, bovino o las aves. Aspectos demográficos, sociales y las políticas económicas tienen importancia capital en el desarrollo de estas actividades. En este sentido, el cambio de orientación en la concesión de ayudas de la Política Agraria Común (PAC) del año 2000 ha hecho descender claramente los censos de nuestras cabañas ganaderas.

(1) Tanto el ovino como el caprino han sufrido un claro retroceso en los últimos años. España contaba con 18,5 millones de cabezas de ovino en 2010, mientras que en 2012 sólo se censaron 16,3 millones. Esto supone una disminución de casi el 12%, sumándose a una tendencia negativa del 10% desde el año 2000.

Según los datos facilitados por el Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino(2), España en 2008 contaba con el 21,9% del total de cabezas de ganado ovino en la Unión Europea (UE) de los 27. En aquel momento únicamente Reino Unido con un 24,4% superaba a España. Este tipo de ganadería se encuentra focalizado sobre todo en países de ámbito mediterráneo como son Grecia (10%), Rumanía (9,8%), Italia (9,1%) y Francia (8,6%) y por ello tienen un contexto social, económico y sanitario singular. Dentro de España, hay comunidades que tradicionalmente se han dedicado más a la explotación de estas especies. El 80% del total de animales de la especie ovina del territorio español se concentra en Castilla y León, Extremadura, Castilla la Mancha, Andalucía y Aragón.

En el sector caprino la situación es bastante similar. Los países de la cuenca mediterránea siguen concentrando el grueso de los censos. Grecia (39,8%), España (22%), Francia (10%), Italia (7,6%) y Rumanía (7,6%) focalizan casi el 90% de la población de caprinos de la UE. Dentro de nuestro país las comunidades que concentran mayor número de cabezas son Andalucía (36,3%), Castilla La Mancha (33,3%),

Canarias (12,4%) y Castilla y León (6,7%). Nuestras tendencias en el consumo de carne evolucionan y el sector caprino español lo ha acusado sobremanera. Desde el año 2002 al año 2008 el consumo de este tipo de carne bajó en casi un 30%. La evolución en el número de cabezas de caprino es similar al de ovino. Mientras que en el año 2010 contábamos con 2,9 millones de animales, en el año 2012 sólo había 2,6 millones, suponiendo un retroceso de un 10% en tan sólo dos años.

A la luz de estos datos, que confirman una tendencia clara de disminución en el número de ovejas y cabras, podemos afirmar que un ajuste del sector puede ser necesario. La búsqueda de sistemas productivos más eficientes, la selección de razas con una mejor adaptabilidad al medio, la modernización de las instalaciones, la mejor formación de los ganaderos y la mejora del estado sanitario de nuestras cabañas deben llevar a un cambio de enfoque en el sector hacia un modelo sostenible por sí mismo y económicamente rentable.

La investigación desarrollada en este trabajo intenta realizar una pequeña aportación en la mejora del estado sanitario de nuestros animales a través del desarrollo de una nueva herramienta de diagnóstico de problemas respiratorios en pequeños rumiantes, y en concreto de aquellos procesos en los que interviene *Mycoplasma ovipneumoniae*. Los procesos respiratorios como las neumonías, son un problema notable en los rebaños, bien sea por la muerte de los animales jóvenes, por los malos resultados de los índices de conversión o por el gasto veterinario, lo que supone una merma tanto en la rentabilidad de la explotación como en el bienestar de los animales.



## 1.2.- Descripción del *Mycoplasma ovipneumoniae*.

*Mycoplasma ovipneumoniae* pertenece a la clase *Mollicutes*, caracterizada por la ausencia de pared celular, simplicidad estructural y un genoma pequeño(3). Su tamaño varía desde 0,1  $\mu\text{m}$  a 0,8  $\mu\text{m}$ , su genoma contiene aproximadamente 1 millón de pares de bases (pb.)(4).

Figura 1. Imagen de microscopía electrónica de *Mycoplasma* spp.



La célula carece de pared celular pero está limitada por una membrana citoplasmática compuesta por una triple lámina.

Este microorganismo es uno de los mycoplasmas que más frecuentemente se aíslan en procesos respiratorios en las especies ovina y caprina(5,6). No obstante, otras especies de mycoplasmas como son *Mycoplasma capricolum subsp. caprineumoniae*, *Mycoplasma mycoides subsp. capri*, *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides LC*, *Mycoplasma capricolum subsp. capricolum*, *Mycoplasma arginini* y *Mycoplasma agalactiae* son frecuentemente identificadas participando de forma concomitante en este tipo de procesos(7).

Aunque tradicionalmente se ha descrito al *Mycoplasma ovipneumoniae* como un patógeno relacionado con procesos aparentemente crónicos y subclínicos(8), en muchas ocasiones su simple crecimiento en los tejidos de animales susceptibles es suficiente para desencadenar una neumonía proliferativa y exudativa(9,10).

### 1.3.- Patogenia.

Este mycoplasma frecuentemente está presente en los epitelios de las cavidades nasales de las hembras reproductoras. No obstante los más afectados por estos procesos son animales de pocas semanas de vida. La transmisión es horizontal y por vía aerógena. El contacto estrecho entre animales hace que las bacterias penetren en la cavidad nasal y vayan colonizando el epitelio hacia vías respiratorias bajas(11). Este microbio puede quedar acantonado en bronquios y bronquiolos durante un tiempo antes de que el hospedador muestre síntomas evidentes de enfermedad, incluso algunos animales permanecerán aparentemente asintomáticos.

Uno de los mecanismos patogénicos utilizados por esta bacteria es su capacidad de adherirse a la membrana plasmática del macrófago del huésped sin desencadenar una respuesta fagocítica(12); ésta debe ir obligatoriamente mediada por la interacción antígeno anticuerpo. La respuesta del huésped mediante la producción de anticuerpos es sumamente específica, incluso a nivel de cepa. Ahora bien, diversos estudios describen hasta 4 cepas diferentes en un mismo animal(13). Este hecho dificulta la respuesta inmune puesto que la producción de anticuerpos irá dirigida frente a la cepa mayoritaria en un primer momento, pero una vez eliminada ésta, otra cepa secundaria surgirá provocando problemas de nuevo en el animal.

Uno de los principales efectos patógenos de este mycoplasma es la disminución de la movilidad de los cilios a nivel de vías respiratorias inferiores debido a su adhesión a los mismos a través de su cápsula compuesta por polisacáridos(14). Se observa entonces una inducción de anticuerpos autoreactivos frente a los antígenos presentes en los cilios del epitelio respiratorio. Este hecho, unido a la disminución de la capacidad fagocitaria de los macrófagos facilita el camino a otros patógenos bacterianos o víricos para colonizar los tejidos y agravar el proceso de la enfermedad.

A priori es complicado proponer una vacuna frente a *M. ovipneumoniae*. La inmunidad generada por ésta debería englobar un conjunto de cepas previamente estudiadas e identificadas en el área geográfica a tratar. Una vacuna que sólo contuviera una única cepa podría no ser realmente efectiva.

#### 1.4.- Influencia del ambiente en la presentación de enfermedades respiratorias en pequeños rumiantes.

Aunque no hay muchos estudios epidemiológicos que relacionen lesiones y procesos respiratorios con las condiciones de vida de los animales, encontramos algunos trabajos que sugieren una conexión de causalidad(11).

Sin duda el medio ambiente al que son sometidos los animales en las distintas fases de su vida tienen su repercusión en la aparición de enfermedades. Los factores climatológicos como el viento, la estación del año, la temperatura, la pluviometría y la humedad del aire están relacionados con la aparición de problemas respiratorios en las explotaciones de ovino(15).

El diseño de las instalaciones parece ser un factor a tener en cuenta, ya que períodos de tiempo donde el ambiente tiene mayor humedad perjudica la ventilación natural de los apriscos, lo que favorece la aparición de problemas neumónicos.

*Mycoplasma ovipneumoniae* es un factor predisponente fundamental para la aparición de neumonías. Este microbio está presente no sólo en procesos crónicos, sino también en bronconeumonías de curso agudo y procesos septicémicos. Dada la diversidad de elementos que deben ser analizados en este grupo de enfermedades algunos autores aciertan en denominar al conjunto de estos elementos como *complejo respiratorio ovino*(15).

#### 1.5.- La neumonía atípica.

La **neumonía atípica** o neumonía no progresiva está considerada como una enfermedad multifactorial, definida por la interacción de *M. ovipneumoniae* con otros agentes patógenos como *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* o *Bibersteinia trehalosi* y con factores como la susceptibilidad del individuo, la patogenicidad de la cepa y aspectos medioambientales como episodios de estrés, hacinamiento de animales, atmósferas sucias y polvorientas, etc...

*Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* son consideradas como principales causantes de *neumonías típicas* en pequeños rumiantes. Sin embargo, una infección primaria con *M. ovipneumoniae* puede predisponer a los animales a sufrir infecciones más graves por *Mannheimia* y *Pasteurella*(11,16). Probablemente *M. ovipneumoniae* no ha tenido en el pasado toda la atención que hubiera merecido, por ello se hace necesario estudiar y desarrollar una forma de detección fiable que ponga de manifiesto su presencia en este tipo de procesos.

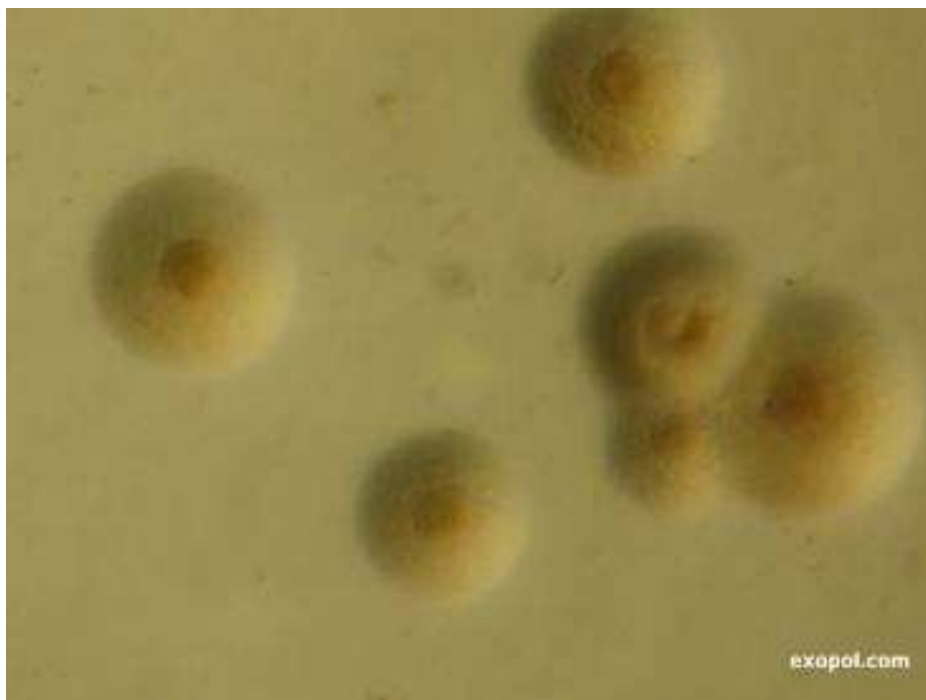
La neumonía atípica afecta principalmente a animales jóvenes, ahora bien, se ha constatado que las infecciones en animales menores de dos meses son infrecuentes(17). Sin embargo, existen trabajos(18-20) donde se describen casos de neumonía atípica en caprinos de tan sólo un mes de edad. Los síntomas que presentan éstos son signos respiratorios severos, disnea y finalmente la muerte. En los subsiguientes estudios macroscópicos y anatomopatológicos realizados a estos animales se encuentra congestión nasal, neumonía bilateral, congestión de los lóbulos craneales y presencia de fibrina en la pleura. Los animales adultos se vieron poco o nada afectados. Finalmente los estudios microbiológicos identificaron la presencia de *Mannheimia*, *Pasteurella*, *M. ovipneumoniae* y *M. arginini*.

Aunque esta enfermedad respiratoria no es necesariamente mortal, acarrea igualmente consecuencias negativas asociadas con pérdidas económicas relacionadas con bajas, disminución de la ganancia media diaria en corderos y cabritillos, reducción de la eficiencia de la alimentación y decomisos en matadero, así como considerables gastos en tratamientos veterinarios.

### 1.6.- La dificultad en el diagnóstico de *Mycoplasma ovipneumoniae*.

El cultivo microbiológico ha venido siendo la principal herramienta diagnóstica para la detección de los mycoplasmas. Sin embargo, esta bacteria presenta muchas dificultades para su aislamiento. Su crecimiento es lento y no siempre es garantía de éxito(20).

Figura 2. Cultivo de *Mycoplasma* sp. (Imagen cedida por Exopol.)



En cultivo, los mycoplasmas forman colonias con un tamaño de 10  $\mu\text{m}$  a 600  $\mu\text{m}$  de diámetro, transparentes y dependiendo de la especie con un centro marcado (no es el caso de *M. ovipneumoniae*). Algunos pueden formar un film característico. Se observan con lupa o microscopio óptico.

Los métodos bioquímicos actuales difícilmente llegan a una conclusión clara e inequívoca en cuanto a la identificación de especie(6). Esto puede deberse a que cuando varias especies diferentes de mycoplasmas están presentes en un tejido al mismo tiempo, éstas pueden ser aisladas simultáneamente puesto que el caldo de cultivo no es específico. Además las técnicas serológicas e inmunológicas tienen claras dificultades debido a la seroreactividad cruzada observada entre las distintas especies de mycoplasmas.

Todos estos inconvenientes hacen de *M. ovipneumoniae* un microbio que a menudo está infradiagnosticado(21), lo que dificulta que los veterinarios de campo realicen el tratamiento más eficaz y apropiado. Así, un proceso con neumonía atípica, en

el que están presentes *Pasteurella*, *Mannheimia* y *M. ovipneumoniae* puede no ser resuelto si únicamente se trata frente a la *Pasteurella* y *Mannheimia*. Recidivas o complicaciones posteriores pueden desencadenarse por la persistencia del mycoplasma.

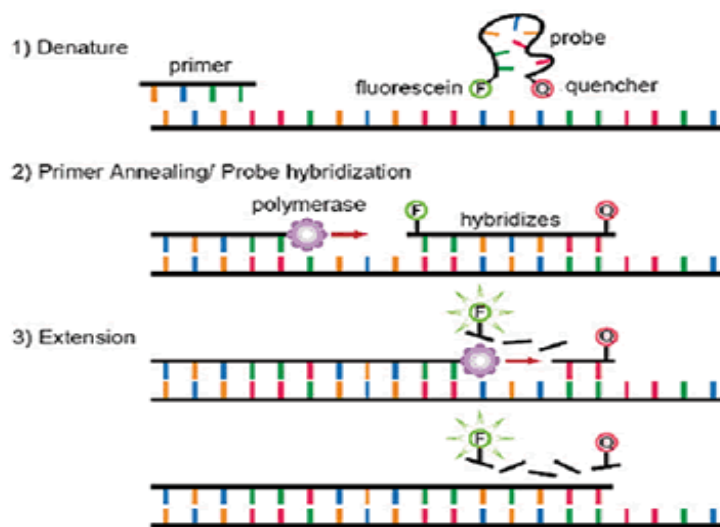
Por todo esto, surge la necesidad de encontrar una técnica mejorada de diagnóstico, que nos permita identificar y cuantificar *M. ovipneumoniae* de una forma rápida, sencilla e inequívoca.

#### 1.7.- Nueva técnica diagnóstica para la detección de *M. ovipneumoniae*: Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR)

En la actualidad tenemos disponibles métodos moleculares que detectan el genoma de un determinado patógeno presente en una matriz biológica. Durante los últimos años se ha optimizado la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) como técnica diagnóstica para su uso en los laboratorios clínicos de forma rutinaria. Además nuevas aplicaciones de esta herramienta han ido surgiendo y mostrándose asequibles a un número mayor de usuarios. Tal es el caso de la qPCR. Esta herramienta presenta una serie de ventajas importantes sobre su predecesora, la PCR convencional, pues parámetros como la especificidad, sensibilidad, repetitividad y manejo se ven claramente mejorados.

La especificidad del ensayo es mayor puesto que entra en juego un tercer elemento de reconocimiento de la secuencia diana. A diferencia de la PCR convencional, añadimos un oligonucleótido interno, también llamado sonda, que reconocerá un fragmento de aproximadamente 25 pb. en la zona interna del amplicón delimitado por ambos cebadores (figura 3). Vemos pues que para tener un resultado positivo de amplificación en este tipo de ensayos, necesitamos que tres elementos tengan suficiente homología con la secuencia diana: cebador directo, cebador reverso y sonda.

Figura 3. Oligo interno. Imagen adaptada de <http://www.foodsafetywatch.com>



La sonda marcada debe hibridarse con la cadena “diana” y posteriormente la actividad exonucleasa de la DNA polimerasa provoca una separación física de la molécula fluorescente del *quencher* o apagador. Es en este momento cuando podemos captar la fluorescencia emitida.

La sensibilidad de la qPCR también es claramente mayor. Los límites inferiores de detección de este tipo de ensayos pueden variar entre 2 y 100 copias por reacción (17)(48). Límite a la que difícilmente llegará la PCR convencional.

La qPCR además nos permite cuantificar la cantidad de DNA diana que tenemos en nuestra muestra. Para ello se registran los valores de los ciclos de amplificación obtenidos (Cq) cuando la señal de fluorescencia cruza el umbral de detección, alcanzando estos Cq un valor menor cuanto mayor es la cantidad inicial de DNA en la reacción. Para un ensayo cuantitativo se construye una recta patrón obtenida con los Cq de las diluciones decimales obtenidas a partir de una cantidad conocida de DNA diana en la que interpolaremos los valores Cq obtenidos en nuestras muestras problema. En muchas determinaciones la cuantificación absoluta es fundamental y por ello quizá sea esta una de las principales ventajas de la qPCR frente a PCR convencional.

La PCR convencional necesita de un sistema de detección del producto de amplificación. Usualmente el producto amplificado se somete a un proceso electroforético seguido de un revelado de los amplicones presentes en la reacción mediante reactivos potencialmente nocivos, como el bromuro de etidio, requiriendo ser

excitados con luz ultravioleta para poder ser visualizados. Toda esta manipulación post amplificación incrementa el riesgo de contaminación del área, personal y útiles del laboratorio.

Todos estos inconvenientes son superados con la técnica qPCR. La señal de amplificación se va leyendo al final de cada ciclo térmico, por lo que la captación de datos es continua durante todo el proceso en el termociclador. No obtenemos pues una lectura a punto final sino una en tiempo real. Con esta característica ahorramos claramente tiempo de trabajo. No hay procesado post amplificación, no se necesita una matriz de separación, aparataje para el proceso electroforético, reactivos de visualización o preparaciones de tampones de carga o de carrera. Evitamos manipulación del producto amplificado puesto que la reacción se lleva a cabo en tubo o placa sellada que no tiene porque ser abierto.

No obstante hay que precisar que los termocicladores equipados con lector de fluorescencia conllevan un mayor coste económico que los convencionales.

La PCR en tiempo real, además, permite al investigador llevar a cabo la detección de distintas dianas contenidas en una única muestra. En las reacciones *multiplex* utilizaremos distintas parejas de cebadores y oligonucleótidos internos que serán marcados con diferentes moléculas fluorescentes. En este trabajo se utiliza una pareja de cebadores y un oligo interno marcado en FAM además de otra pareja de cebadores con su oligo marcado en HEX. El primero detecta el genoma específico del *M. ovipneumoniae* mientras que el segundo detecta un gen *housekeeping* (constitucional) que será utilizado como control interno del proceso de extracción y amplificación. Aunque en los orígenes de esta técnica se llegaron a diseñar reacciones *multiplex* con gran número de reacciones simultáneas, la experiencia de las casas comerciales va reduciendo los ensayos a *dúplex* o *triplex*. Problemas de competencia de reactivos por cantidades pequeñas de DNA o la interferencia de las diferentes longitudes de onda de las moléculas fluorescentes han sido las principales dificultades en la utilización de reacciones *multiplex*.



### 1.8.- Análisis filogenético de los mycoplasmas basado en el gen codificante para la fracción 16S del RNA ribosomal (rRNA).

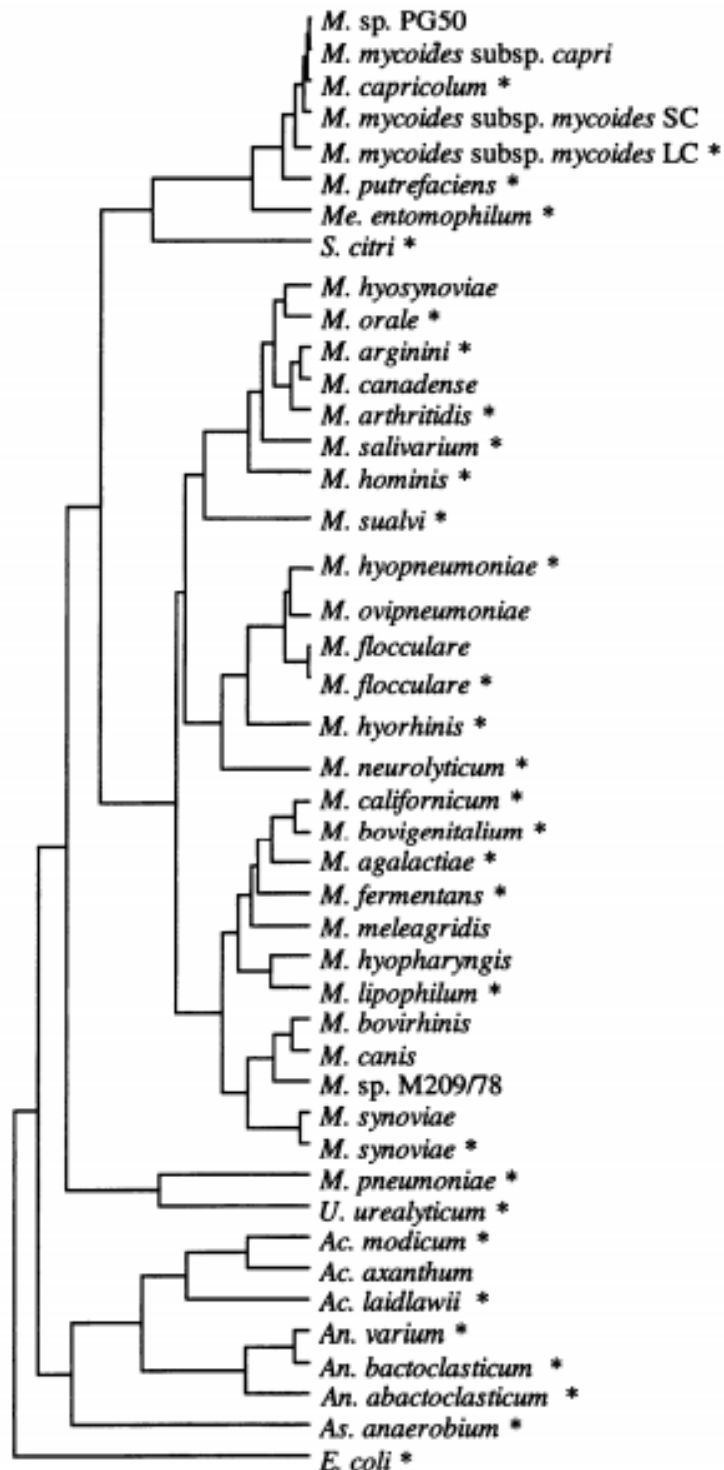
La clase *Mollicutes* son organismos procariotas que tiene un tamaño y un genoma anormalmente pequeño. Dentro de esta clase se localizan los mycoplasmas, los cuales constituyen una gran variedad de especies. Hasta el momento más de 90 especies diferentes han sido aisladas en humanos, animales, insectos y plantas(22).

Multitud de estudios de filogenia han sido desarrollados en detalle a partir del análisis de la secuencia perteneciente a la región del genoma que codifica la fracción 16S del rRNA(23). Se ha secuenciado esta región en al menos 50 especies de mycoplasmas y microorganismos filogenéticamente próximos y se han establecido las bases para su clasificación filogenética(24).

Los mycoplasmas generalmente tienen uno o dos operones de rRNA y la organización de los mismos es, en ocasiones, diferente de otros microorganismos procariotas.

La secuenciación y análisis de esta región del genoma es una de las herramientas más útiles para determinar las interrelaciones filogenéticas e identificar los mycoplasmas a nivel de especie. Esto es posible debido a que contiene regiones con secuencias altamente conservadas a nivel de género pero también regiones con alta variabilidad de secuencias a nivel de especie. Esta característica en concreto hace de este gen un candidato ideal para la identificación de género y especie. Conviene poner de relevancia que las moléculas de rRNA forman parte de todos los ribosomas y por ello podrían ser utilizados como diana para estudios de expresión génica. Dada esta función fundamental en la vida de la célula, prevemos encontrar multitud de copias de estas secuencias a lo largo del genoma del mycoplasma, lo que aumenta la sensibilidad del ensayo.

Figura 4. Clasificación filogenética de los mycoplasmas en función de la secuenciación del gen 16S rRNA. Bertil Petterson.(35)



Dendograma que representa las relaciones filogenéticas entre cepas de *Mollicutes* secuenciando la subunidad 16S del rRNA. El dendograma se basó en la secuencia de 554 pb. que contenía información de las regiones variables V6, V7 y V8.

El primer genoma completo de *M. ovipneumoniae* se publicó en Septiembre de 2011(4). Se describió un genoma con un tamaño aproximado de  $10^6$  pb con un contenido en Guanina + Citosina de 29%. Describe unas 860 CDS (secuencias putativas codificantes) con una media de 950 pb. cada una. Esto implica que el 80.5% del genoma de los mycoplasmas sea codificante. El genoma de *M. ovipneumoniae* presenta un único operón 16S-23S rRNA separado del operón 5S rRNA.

Otros genes son codificantes de factores de virulencia. Las hemolisinas (hlyA, hlyC), las enzimas productoras de especies reactivas de oxígeno (glpF, glpK y glpD) o las adhesinas (P102, P146, P97 o P76) fueron consideradas como potenciales dianas específicas por su papel clave en la patogenicidad del microorganismo.

Sin embargo, la ausencia de una cantidad suficiente de estas secuencias depositadas en las bases de acceso público hizo desechar todas estas opciones. Proteínas de shock térmico (HSP70) han sido evaluadas en otros trabajos(25) pero contaban con gran homología con *Mycoplasma hyopneumoniae* restándole especificidad al ensayo.

Finalmente, varios autores ya han publicado ensayos de PCR convencional para la identificación de especies de mycoplasmas y en concreto para la detección de *M. ovipneumoniae* a través del gen 16S rRNA(26).

## **2.- OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO.**

Habiendo evidenciado las limitaciones del diagnóstico tradicional de los agentes etiológicos de la neumonía atípica, el objetivo de este estudio es proponer una herramienta alternativa para su diagnóstico microbiológico y bioquímico clásico. El trabajo trata de **desarrollar y validar una PCR en tiempo real (qPCR) que detecte *Mycoplasma ovipneumoniae*** para el estudio de casos de neumonías remitidos al laboratorio.

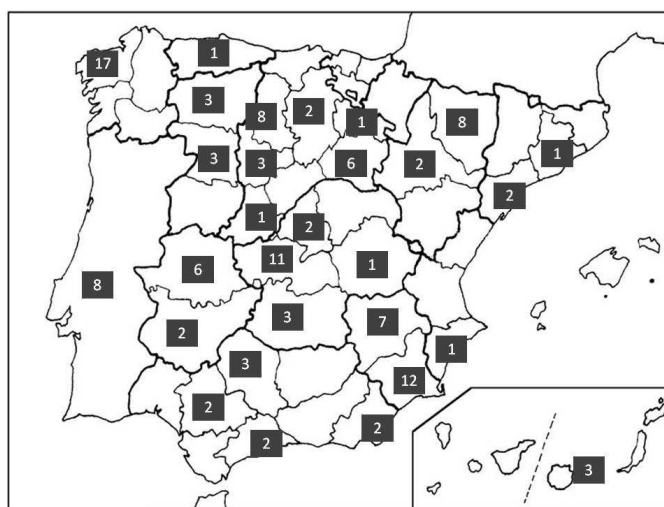
Además se **valorará la presencia concomitante de los distintos agentes etiológicos descritos en la neumonía no progresiva: *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Bibersteinia trehalosi*, *Mycoplasma ovipneumoniae*, *Mycoplasma arginini* y *Mycoplasma mycoides cluster*** en pulmones de ovino y caprino cuyas lesiones macroscópicas y anatomopatológicas resulten compatibles con neumonía.

### **3.- MATERIALES Y MÉTODOS.**

#### **3.1.- Muestras biológicas.**

Ciento veintitrés muestras con sospecha de patología respiratoria de etiología infecciosa fueron incluidas en este estudio. Las muestras procedían de explotaciones de ovino/caprino localizadas en 29 provincias diferentes de España y Portugal. Las muestras se recogieron entre el año 2011 y el año 2013. .

Figura 5. Distribución geográfica del origen de los casos analizados.



En la imagen se muestra el número de muestras remitidas desde cada provincia española y Portugal. Dichas muestras provienen de todas las comunidades autónomas exceptuando Islas Baleares, Navarra, País Vasco y Cantabria.

Por especie animal, 44 de las muestras provenían de caprinos, 78 de ovinos y 1 muestra de cévido. Las muestras pertenecían a casos diagnósticos remitidos al laboratorio EXOPOL, recibándose órganos seleccionados según criterio diagnóstico del veterinario de campo.

Atendiendo al tipo de muestra seleccionada, se estudiaron 105 casos de pulmones provenientes de animales ya necropsiados y 18 casos de lavados traqueobronquiales provenientes de animales todavía con vida. Cada caso podía estar constituido por una o varias muestras, nunca analizando conjuntamente más de 5 pulmones o 5 exudados.

### 3.2.- Cultivo microbiológico.

#### 3.2.1.- Aislamiento de mycoplasmas.

Para investigar la presencia de *Mycoplasma* spp. y su posterior identificación, las muestras fueron inicialmente cultivadas en medio sólido modificado Eaton's. Dicho medio estaba compuesto por 0.035 µg/mL de agar mycoplasma (Oxoid CM401), 4 µL/mL de Tween 80 qp (Panreac 212050), extracto fresco de levadura y además suplementado con suero equino al 20% (BioSciences HA002), 250 µg/mL de Ampicilina (Sigma A9518), 200 µg/mL de acetato de talio (Sigma T8266). Las placas se incubaron en cámara húmeda a 37°C un máximo de 7 días antes de dar resultado negativo.

En caso de crecimiento de colonias compatibles con mycoplasma se hizo una resiembra en el caldo específico para mycoplasmas PPLO (Difco 255420), suplementado con suero equino al 20% (BioSciences HA002), 250 µg/mL de Ampicilina (Sigma A9518), 200 µg/mL de acetato de talio (Sigma T8266) y 1% de rojo fenol (PANREAC 131615). Este cultivo se mantiene a 37°C un máximo de 48 horas. Las colonias compatibles con *Mycoplasma* spp. se sometieron a pruebas de ureasa (urea 1%, Panreac), inhibición de crecimiento en presencia de digitonina (digitonina 1,5%, Sigma) y tinción de Diene's (azure II 1,25%, Sigma; maltosa 10%, Sigma; azul metileno 2.4%)(27)

Los cultivos en medio Eaton's que formaron colonias irregulares y sin centro marcado y además disminuyeron el pH de del caldo PPLO virándolo a amarillo, fueron consideradas como potencial aislamiento de *M. ovipneumoniae*.

#### 3.2.2.- Aislamiento de otras bacterias de interés.

Además de la investigación de mycoplasmas, las muestras fueron sujeto de aislamiento microbiológico. Fueron sembradas en agar sangre Columbia (OXOID PB5039A) y agar McConkey (OXOID CM0115), incubadas a 37°C durante 24 horas. Tras la incubación las colonias aisladas se identificaron mediante las pruebas bioquímicas citadas en el anexo III.

### 3.3.- Aislamiento del ácido nucleico de las muestras y su control de calidad.

Todas las muestras procedentes de los 123 casos estudiados fueron sometidas a aislamiento de DNA. Las muestras fueron pretratadas con el objeto de obtener una suspensión de células individuales.

#### 3.3.1- Pretratamiento de las muestras procedentes de **lavados traqueobronquiales**.

Los lavados traqueobronquiales se procesaron en conjunto cuando fue necesario, nunca más de cinco lavados por pool y siempre del mismo caso. Se tomaron 200 µL de cada uno y se llevaron a microtubo de 1.7 µL. El contenido se homogeneizó y se centrifugó a 10.000xg durante 5 minutos. Se tomaron los 200 µL del precipitado y se llevaron a otro microtubo de 1.7 µL en el que previamente se había dispensado 200 µL de solución tampón fosfato (0.015 M y pH=7.3). A continuación este microtubo se introdujo en el homogeneizador (Magna Lyser, Roche) a 2.500 rpm durante 25 segundos. Tras esta operación se centrifugó a 10.000xg durante 1 minuto y tomamos 200 µL del sobrenadante para seguir adelante con el aislamiento de DNA en el extractor automático

#### 3.3.2.- Pretratamiento de las muestras procedentes de **pulmones**.

Se seleccionó una porción inferior a 0,1 gramos de cada pulmón. Cuando convino, se trabajó en conjunto las muestras, nunca más de 5 pulmones por conjunto y siempre del mismo caso. Esas porciones seleccionadas se depositaron en un microtubo de 1,7 µL con 200 µL de solución tampón fosfato (0,015 M y pH=7.3) y una perla metálica. Este microtubo lo se introdujo en homogenizador (Magna Lyser, Roche) a 2.500 rpm durante 25 segundos. Tras esta operación se centrifugó el microtubo a 10.000xg durante 1 minuto para depositar todos los residuos celulares en el fondo del microtubo. A continuación se tomó del sobrenadante 200 µL para seguir continuar con el aislamiento de DNA en el extractor automático.

### 3.3.3.- Aislamiento del DNA.

Las operaciones propias del aislamiento del DNA a partir de las muestras pretratadas, se llevaron a cabo en un robot de extracción automática. (LabTurbo 36 Compact System C3620)(figura 6) que usa su propio kit comercial de reactivos de extracción (Genomic mini Kit LGD 500).

Figura 6. Extractor automático de ácidos nucleicos. (Imagen cedida por Exopol).



La elección de este tipo de extracción supuso tres ventajas principales. Primera, la extracción en esta clase de dispositivos es más uniforme y responde a unos estándares de calidad normalizados. Segundo, permite trabajar un número considerable de muestras a la vez, ahorrando tiempo de trabajo del operario. Y por último, al evitar parte de la manipulación de las muestras y reactivos, disminuimos el riesgo de contaminaciones cruzadas entre unas muestras y otras y los propios reactivos.

### 3.3.4.- Control de calidad del DNA aislado. Análisis de concentración y pureza.

Cada ácido nucleico extraído se sometió a un control de calidad mediante técnicas de espectrofotometría de absorción ultravioleta. Para ello se utilizó el espectrofotómetro Quawell UV Q5000 (software 4.0) configurado para medir absorbancia a  $\lambda=230$  nm,  $\lambda=260$  nm y  $\lambda=280$  nm.

El DNA debido a las estructuras aromáticas de sus bases nitrogenadas, absorbe un máximo de radiación ultravioleta a  $\lambda=230$  nm, mientras que otro tipo de componentes como los compuestos fenólicos o las proteínas absorben a 230 nm y 280 nm respectivamente. Estos últimos componentes son claramente inhibidores de la acción de la DNA polimerasa. Muestras con absorbancias elevadas en  $\lambda=230$  nm y  $\lambda=280$  nm o con cantidades de DNA inferior a 5 ng/ $\mu$ L no son admitidas en el proceso de amplificación del DNA.



### 3.4.- PCR en tiempo real para la identificación de distintos mycoplasmas

#### 3.4.1.- Ensayo qPCR de *Mycoplasma ovipneumoniae*.

Se llevó a cabo un estudio del genoma de *M. ovipneumoniae* eligiéndose el gen codificante de la subunidad 16S del rRNA. (ver epígrafe 1.7) Adaptando el trabajo previo de otros autores(26) a las características propias de la PCR en tiempo real con sonda marcada con molécula fluorescente.

Para el diseño de los cebadores directo (ovip 2F), reverso (ovip1R) y sonda marcada en FAM (ovip1S) se utilizó una combinación de programas de libre acceso (Primer3Plus <http://primer3plus.com/> y Tm calculator de Appliedbiosystems). Las secuencias se muestran a continuación. Para ver situación en el gen ver Anexo I.

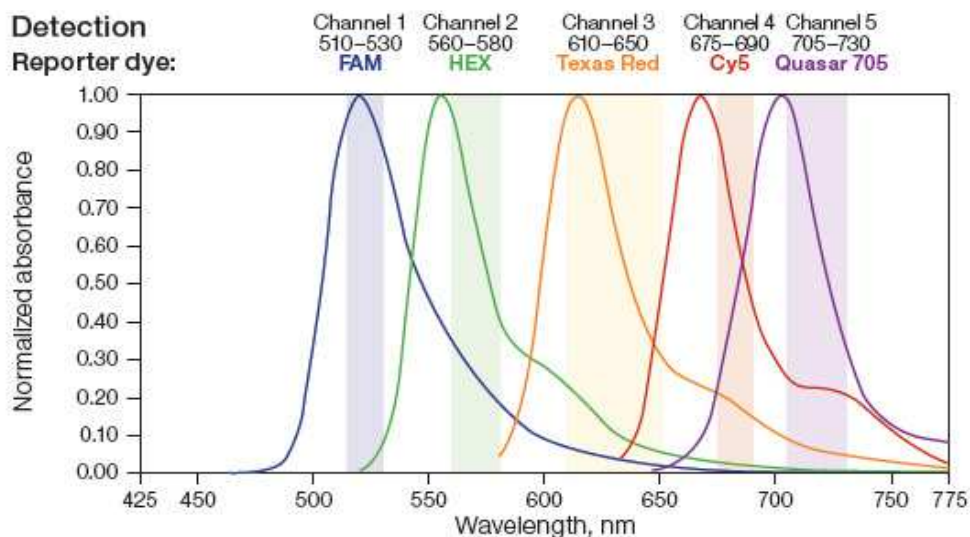
Ovip2F	Primer Forward:	5'- TTTTGGACCGGGATAACCAT – 3'
	Tm=59.83	GC%: 45                  20pb
Ovip1R	Primer Reverse:	5'- CTTACTGCTGCCTCCCGTAG – 3'
	Tm=58.55	GC%: 60                  20pb
Ovip1S	Sonda:	5'- GCAACATTAGTTAGTTGGTAGGGTAAA – 3'
	Tm=58.92	GC%: 37                  27pb

El producto de esta PCR tiene una longitud de 235 pb. La sonda que se ha utilizado en este estudio tiene dos moléculas con función de desactivación de fluorescencia o *quencher* (ZEN-IOWA BLACK, PCT US 7803536). La molécula ZEN se coloca entre el noveno y décimo nucleótido empezando por extremo 5'y la molécula IOWA BLACK se coloca en el extremo 3' del oligo interno. En el extremo 5' se marca la sonda con FAM, una molécula fluorescente que tiene su máximo de emisión a una longitud de onda entre 510 y 530 nm.

El ensayo finalmente se diseñó en una reacción dúplex, en el que la segunda reacción de PCR en Tiempo Real tiene como diana un gen constitucional o *housekeeping*(28). Esta segunda reacción contará con una sonda cuya molécula reportera emitirá en una longitud de onda diferente. Concretamente marcaremos este segundo oligo interno con la molécula HEX, que tiene su máximo de emisión entre 560

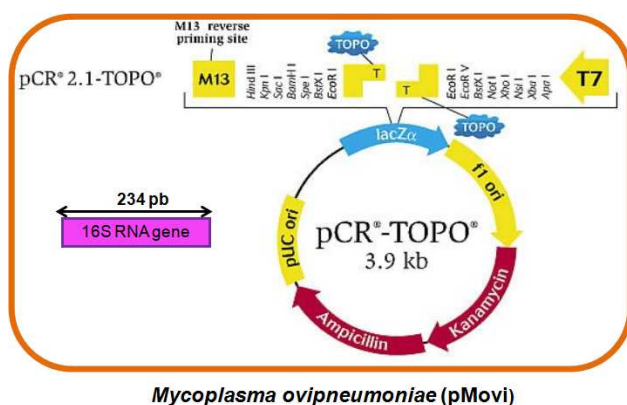
nm y 580 nm. Esta diferencia entre los picos de emisión de FAM y HEX permitió discriminar ambas señales y tomar datos de ambas de forma independiente aunque sus respectivas reacciones tuvieran lugar en el mismo pocillo.

Figura 7. Espectros emisión en moléculas utilizadas para qPCR. Imagen adaptada de bio-rad.



La señal de FAM puede ser detectada a través del filtro de HEX (560-580 nm), lo que hace que debamos ajustar los ensayos dúplex para evitar solapamiento de señales y resultados erróneos.

Como control positivo de la reacción, que denominaremos a partir de ahora pMov, utilizamos un plásmido comercial (pCR 2.1-TOPO) de 3,9 kilobases en el que se clonó la secuencia diana acotada por los primer ovip2F y ovip1R(29).



El plásmido utilizado tiene genes de resistencia a ampicilina y a kanamicina, fundamentales para el crecimiento de las bacterias transformadas en medio selectivo.

Los extremos de la zona de poli-T servirán para clonar el fragmento deseado, en este caso la secuencia diana de nuestra PCR. El gen reportero lacZα evidenciará si las colonias crecidas en el agar han incorporado el fragmento.

Figura 8. Plásmido utilizado para clonación de pMov. Imagen adaptada de invitrogen.

La reacción de PCR se verificó en un volumen total de 20  $\mu$ L. Esta reacción estaba compuesta de 10  $\mu$ L de Master Mix (SensiFAST Probe No-ROX Mix 2X, BIOLINE), 1  $\mu$ L de una mezcla de cebadores ovip2F, ovip1R y sonda ovip1S donde los cebadores tienen aproximadamente el doble de concentración que la sonda, 4  $\mu$ L de

agua libre de DNAasa y RNAasa. Finalmente se añade 5 µL del DNA diana. En el caso del control positivo de la reacción se añadió 5 µL de pMov y en el caso del control negativo 5 µL de agua.

El programa térmico se muestra en la Tabla I alcanzando una duración total de 1 hora y 5 minutos.

Tabla I. Programa térmico de la reacción de qPCR.

	ACCIÓN	TEMP	TIEMPO	
1º	Activación	95°C	5 minutos	1 ciclo
2º	Desnaturalización	95°C	10 segundos	40 ciclos
	Anillamiento/Elongación	95°C	50 segundos	

Las amplificaciones se realizaron en el termociclador StepOne Real Time PCR y después analizadas con el StepOne Software V2.2.2. de Applied Biosystems.

### Validación del ensayo qPCR de *M. ovipneumoniae*.

Para una conveniente validación de *M. ovipneumoniae* qPCR se llevaron a cabo estudios de sensibilidad, especificidad y precisión y se analizaron los parámetros estadísticos de calidad de la reacción.

Para los estudios de **sensibilidad** se utilizaron 10 cepas de campo aisladas y referenciadas como *M. ovipneumoniae* por la Universidad de Bari (Italia) (ver Tabla II) además del plásmido clonado pMov.

Tabla II. Cepas autóctonas de *M. ovipneumoniae*.

M65813	M65284
M65939	M66987
M64666	M62275
M65871	M65113
M65167	Pca078

En el estudio de **especificidad**, se realizaron alineamientos de secuencias de los oligos diseñados (Ovip2F, Ovip1R y Ovip1S) frente a las secuencias depositadas en genbank de *M. ovipneumoniae* (i.e. JN257121, JN257120, EF687778, DQ000588)

mediante la aplicación libre BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) y Primer BLAST. Adicionalmente, tras el estudio *in silico* se utilizaron esas mismas 10 cepas de campo (ver Tabla II), y 36 DNA extraídos de diferentes microorganismos (ver Tabla III). El panel de validación incluía los principales virus, bacterias y protozoos relacionados con el aparato respiratorio de pequeños rumiantes además de otras especies de mycoplasmas filogenéticamente próximos a *M. ovipneumoniae* como son *M. agalactiae*, *M. arginini*, *M. mycoides cluster LC* y *M. bovis*.

Tabla III. Panel de especificidad.

<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (APP1)	<i>Listeria monocitogenes</i>
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (APP2)	Virus Maedi Visna
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	<i>Mannheimia haemolytica</i>
<i>Bibersteinia trehalosi</i>	<i>Mycobacterium avium</i>
Virus de la lengua azul	<i>Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis</i>
Virus de la enfermedad de la frontera	<i>Mycoplasma agalactiae</i>
<i>Bordetella</i>	<i>Mycoplasma arginini</i>
<i>Brucella abortus</i>	<i>Mycoplasma bovis</i>
Virus Herpes caprino	<i>Mycoplasma mycoides cluster</i>
<i>Corynebacterium bovis</i>	<i>Neospora caninum</i>
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
<i>Coxiella burnetii</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
<i>Enterococcus spp.</i>	<i>Salmonella enterica</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Histophilus somni</i> (ovine)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Leptospira spp.</i>	<i>Streptococcus canis</i>
<i>Listeria ivanovii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>

El panel incluye el DNA o RNA proveniente del aislamiento microbiológico desarrollado en Exopol o de vacunas comerciales de las 36 entidades citadas en el cuadro superior. Obsérvese que otros agentes de la neumonía atípica como son *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* y *Bibersteinia trehalosi* están incluidos en la validación.

Los estudios de **precisión** intra ensayo se diseñaron conforme a las normativas vigentes de validación de ensayos para diagnóstico. Se realizaron 7 diluciones decimales de un DNA estándar de concentración conocida (pMov). Cada dilución se amplificó hasta un total de 5 veces para conformar una recta de regresión en cuyo rango dinámico se interpolaron los Cq resultantes de las 10 cepas de campo y 4 muestras clínicas positivas.

### **3.4.2.- qPCR utilizadas para la investigación de otros mycoplasmas estudiados en este trabajo.**

Para investigar la presencia de otros mycoplasmas en las muestras se utilizaron diferentes ensayos de qPCR. Es el caso de *M. arginini*, *M. agalactiae* y *M. mycoides cluster*. *Mycoplasma arginini* fue investigado en las 123 muestras pero *M. agalactiae* y *M. mycoides cluster* sólo fueron estudiados en casos donde la qPCR a *M. ovipneumoniae* resultó positiva.

La qPCR para *M. arginini* y *M. agalactiae*(30) están diseñadas y convenientemente validadas por EXOPOL y cuentan con una reacción dúplex donde la amplificación del gen constitucional actúa a modo de control interno del proceso de extracción y amplificación.

Para la determinación de *M. mycoides cluster* se utilizó un kit comercial (genesig, Primer Design).

Todos estos ensayos de qPCR se verificaron en el mismo termociclador StepOne Real Time PCR (Applied Biosystems) con idéntico protocolo térmico (ver Tabla I).

### **3.5.- Análisis de datos estadísticos.**

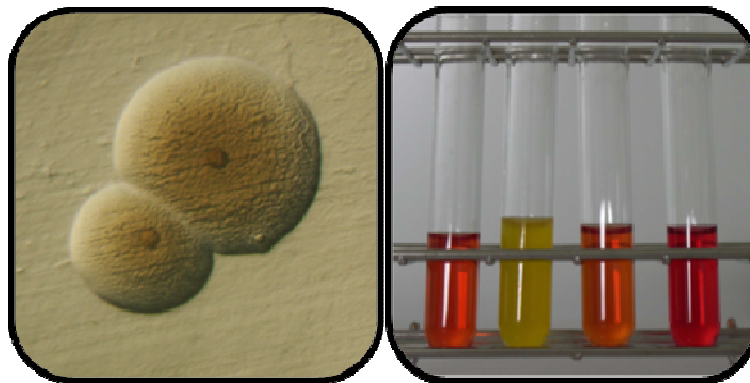
Para analizar la relación estadística de asociación se sometieron los resultados obtenidos al análisis chi cuadrado ( $X^2$ ) con el programa de acceso libre Vassarstats.

#### 4.- RESULTADOS.

##### 4.1.- Cultivo microbiológico, aislamiento de mycoplasmas.

De los 123 casos llevados a cultivo tan sólo se confirmó en 14 el aislamiento de *M. ovipneumoniae*. En 22 casos la contaminación de la muestra es tan alta que no se puede continuar con el proceso de aislamiento de mycoplasmas.

Figura 9. Cultivo e identificación de *M. ovipneumoniae*. (Imagen cedida por EXOPOL).



Los aislamientos de *M. ovipneumoniae* forman colonias sin un centro bien definido aunque se produzcan varios pases del cultivo. *M. ovipneumoniae* fermenta la glucosa lo que hace que el medio torne a amarillo por la bajada del pH. Esta característica es común a *M. mycoides* LC aunque en éste el efecto se observa mucho más rápido. *M. ovipneumoniae* provoca un viraje del medio mucho más lento y hace que en ocasiones pase inadvertido.

##### 4.2- Cultivo microbiológico, aislamiento de otras bacterias de interés.

En total 53 casos presentan aislamiento para una o varias de estas bacterias que podríamos asociar a la neumonía atípica. En 10 casos se identificaron al menos dos de estos agentes.

Tabla IV. Resultados del aislamiento microbiológico de otras bacterias de interés.

Microorganismo	nº aislamientos	Porcentaje
<i>Pasteurella multocida</i>	20	16,26%
<i>Mannheimia haemolytica</i>	41	33,33%
<i>Bibersteinia trehalosi</i>	3	2,43%

### 4.3 Control de calidad de los ácidos nucleicos.

Todas las extracciones de ambas matrices orgánicas, lavados traqueobronquiales y pulmones, superan el control de calidad impuesto en el epígrafe 3.3.3 de materiales y métodos.

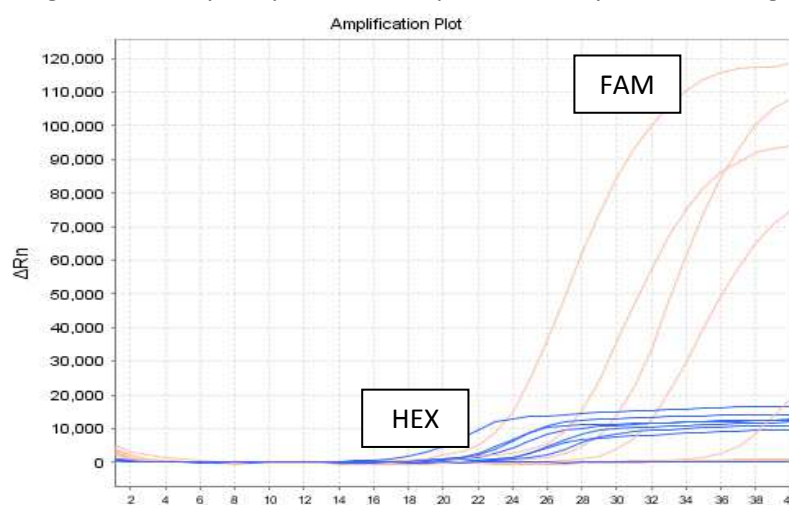
### 4.4 Validación del ensayo qPCR de *M. ovipneumoniae*.

#### Estudio de **sensibilidad**:

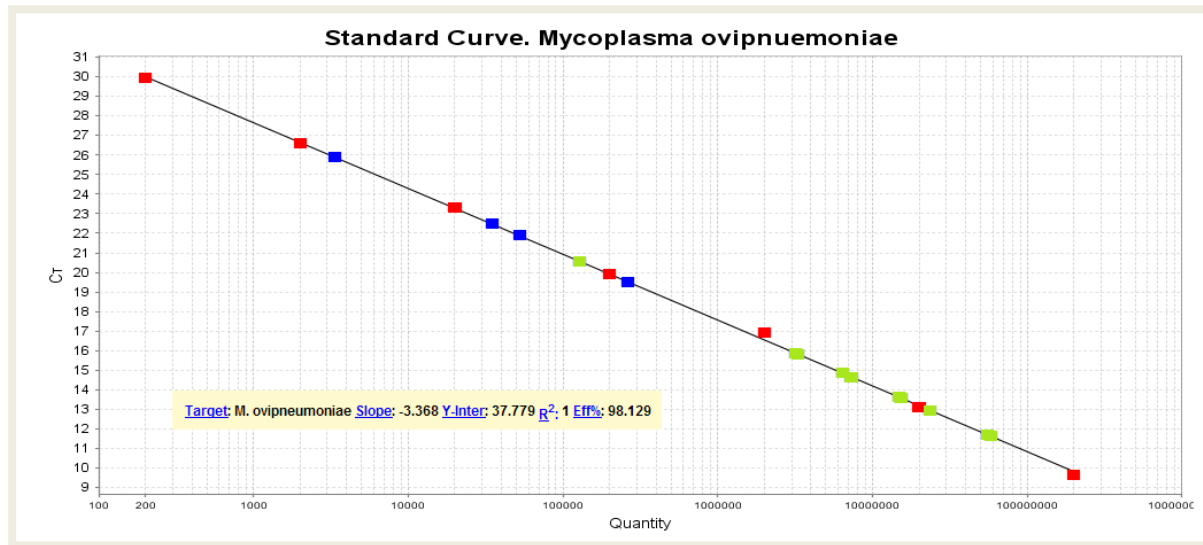
Las diez cepas autóctonas de campo referenciadas como positivas por la Universidad de Bari también resultaron positivas para nuestra qPCR. Además, los 14 casos donde el cultivo de *M. ovipneumoniae* tuvo éxito el ensayo qPCR obtuvo igualmente resultado positivo.

El plásmido utilizado como control positivo pMov también resultó positivo en la validación. Este control se usó para determinar la sensibilidad analítica. El límite máximo de detección observado fue de  $2,0 \cdot 10^8$  copias por reacción y el límite mínimo de detección fue de  $2,0 \cdot 10^2$  copias por reacción. Los valores estadísticos de calidad ( $R^2$ , Pendiente, Intersección con el eje de ordenadas y Eficiencia) de la reacción de qPCR se observan en la figura 11.

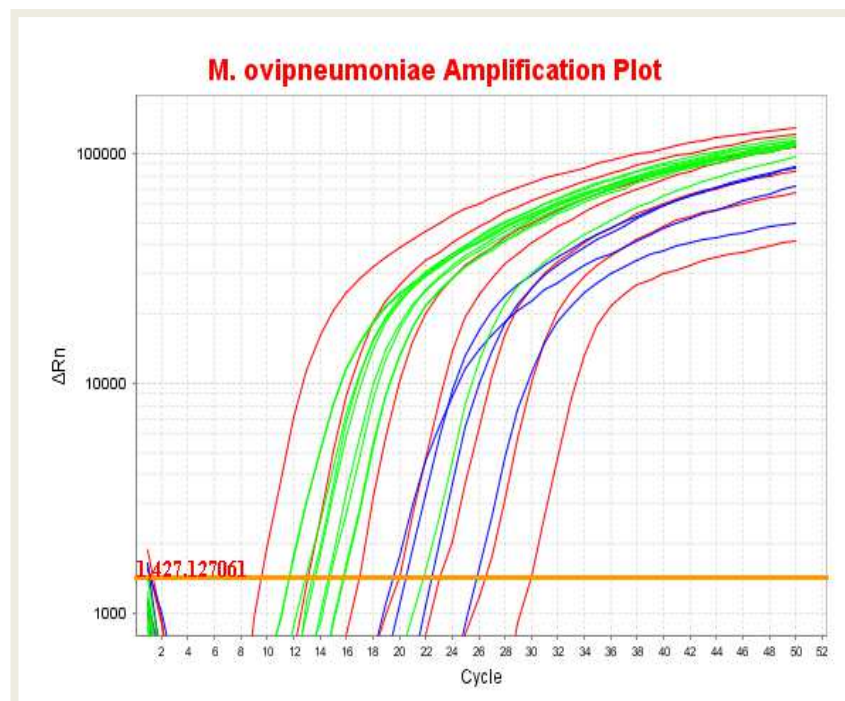
Figura 10. Ensayo dúplex de *M. ovipneumoniae* y control endógeno



En esta gráfica observamos en color rosa muestras positivas a *M. ovipneumoniae* que emiten su fluorescencia por el canal FAM. Además observamos en color azul la señal de cada una de las muestras que emiten por el canal HEX/VIC debido a la presencia del gen constitucional que utilizamos a modo de control interno.

Figura 11. qPCR para *M. ovipneumoniae*, curva estándar.

Gráfica generada por programa StepOne V2.2.2. (Applied Biosystems). Las señales en rojo indican puntos de la recta estándar que corresponde a diluciones decimales de pMov. El rango de valores varía entre  $2,0 \cdot 10^2$  a  $2,0 \cdot 10^8$  copias por reacción. En azul se representan las muestras clínicas positivas y en verde las cepas de campo autóctonas. Todas ellas se incluyen en el rango dinámico de cuantificación.

Figura 12. qPCR para *M. ovipneumoniae*, vista exponencial del gráfico de amplificación.

Gráfica generada por programa StepOne V2.2.2. (Applied Biosystems). Aquí vemos que el valor del umbral (línea naranja) a partir del cual calculamos los valores Cq de cada muestra amplificada puede ajustarse en torno a 200 unidades de  $\Delta Rn$ . Por debajo de este nivel no encontramos señal de fluorescencia basal o “ruido de fondo” de la amplificación.



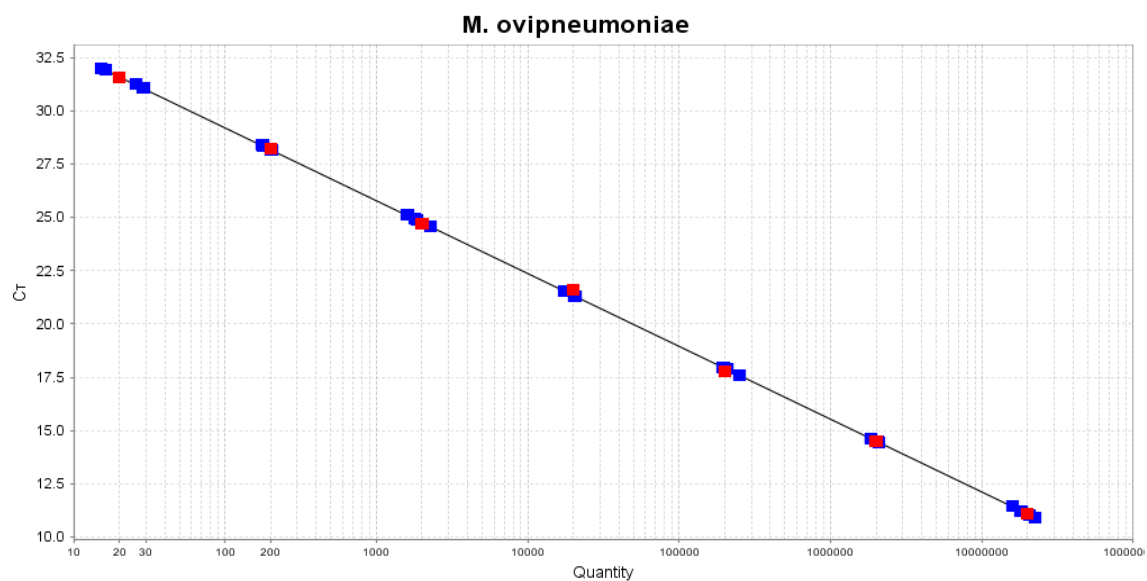
### Estudio de **especificidad**:

No se obtuvo amplificación en ninguna de las 36 entidades descritas en el panel de especificidad mostrado en la Tabla III.

### Estudio de **precisión**:

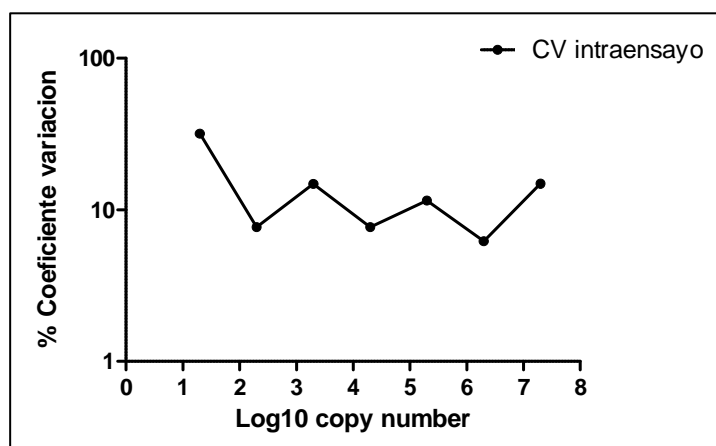
Los datos del estudio de precisión intra ensayo obtuvieron unos coeficientes de variación cuyo rango fue 6,2% - 31,8%.

Figura 13. qPCR para *M. ovipneumoniae*, estudio de precisión.



Amplificación de 7 diluciones decimales con 5 réplicas por dilución. En rojo se señala el valor previsto para cada una de las diluciones. Los puntos azules corresponden a cada una de las amplificaciones realizadas para las 7 diluciones decimales. La mayor dispersión observada se encuentra en la dilución correspondiente a  $2,0 \cdot 10^1$  copias por reacción.

Figura 14. Coeficientes de variación de las distintas diluciones decimales de pMov.



Los coeficientes de variación con valores más altos corresponden a las diluciones decimales de pMov con número de copias menor. Obsérvese que los valores de los distintos puntos correspondientes a las diluciones decimales orbitan alrededor de un coeficiente de variación del 10%.

#### 4.5.- Validación del ensayo qPCR de *M. ovipneumoniae* con muestras clínicas.

(En el anexo II se muestra tabla resumida de datos de la investigación.)

Una vez estudiadas las 123 muestras, tan sólo 14 (11.4%) obtuvieron aislamiento microbiológico de *M. ovipneumoniae* mientras que por qPCR, 45 muestras (36.6%) fueron positivas.

Once casos positivos a *M. ovipneumoniae* por qPCR mostraron una contaminación tan profusa que impidió el aislamiento microbiológico. Esto supone que un potencial aislamiento se ha visto impedido en el 25% de las muestras positivas por qPCR.

De un total de 78 casos de la especie ovina, 20 resultaron positivos por qPCR, lo que supone un 25,6%. En cambio en la especie caprina, de un total de 44 casos, 25 resultaron positivos, dando una positividad del 56,81%

Atendiendo a la naturaleza de las muestras biológicas, los lavados traqueobronquiales tuvieron una positividad (83.3%) significativamente mayor que la de los pulmones (28.6%). ( $p > 0.001$ ;  $X^2 = 19,26$ ).

#### Estudio de coinfecciones:

##### Coinfecciones por mycoplasmas:

Ocho muestras (6,5%) fueron positivas únicamente a *M. ovipneumoniae*. En cambio, otros mycoplasmas fueron detectados por qPCR en los 45 casos positivos a *M. ovipneumoniae*.

Tabla V. Presencia de otros mycoplasmas en las muestras positivas a *M. ovipneumoniae*.

Analizados los 45 casos positivos al ensayo qPCR de <i>M. ovipneumoniae</i> :		
<b><i>Mycoplasma</i> detectado</b>	<b>nº casos</b>	<b>Porcentaje</b>
<i>M. mycoides cluster</i>	2	4,4%
<i>M. agalactiae</i>	8	17,8%
<i>M. arginini</i>	12	26,66%

Coinfecciones por otras bacterias de interés en el estudio de neumonías:

Otras bacterias de interés fueron detectadas por cultivo microbiológico en los 45 casos positivos al ensayo qPCR de *M. ovipneumoniae*. Los resultados se detallan a continuación en la Tabla VI.

Tabla VI. Presencia de otras bacterias de interés en las muestras positivas a *M. ovipneumoniae*.

Analizados los 45 casos positivos al ensayo qPCR de <i>M. ovipneumoniae</i> :		
<b>Bacteria coinfectante</b>	<b>nº casos</b>	<b>Porcentaje</b>
<i>P. multocida</i>	10	22,2%
<i>M. haemolytica</i>	24	53,3%
<i>B. trehalosi</i>	2	4,44%

Los resultados de coinfección por las bacterias estudiadas (*Pasteurella*, *Mannheimia* o *Bibersteinia*) con *M. ovipneumoniae* difieren según la técnica utilizada para la investigación de *M. ovipneumoniae*, aislamiento microbiológico (ver Tabla VII) o qPCR (ver Tabla VIII).

Tabla VII. Resultados de coinfección cuando se investiga *M. ovipneumoniae* por **cultivo microbiológico**.

TOTAL 123 MUESTRAS	Presencia bacterias estudiadas	Ausencia bacterias estudiadas
<i>M. ovipneumoniae</i> POS	11	3
<i>M. ovipneumoniae</i> NEG	41	68

Hay una asociación estadística **significativa** ( $p < 0,005$ ;  $X^2 = 8,36$ ) entre la presencia de *Mycoplasma ovipneumoniae* investigado por técnicas microbiológicas y la presencia de otras bacterias estudiadas.

Tabla VIII. Resultados de coinfección cuando se investiga *M. ovipneumoniae* por **qPCR**.

TOTAL 123 MUESTRAS	Presencia bacterias estudiadas	Ausencia bacterias estudiadas
<i>M. ovipneumoniae</i> POS	31	14
<i>M. ovipneumoniae</i> NEG	22	56

Hay una asociación estadística **muy significativa** ( $p < 0,0001$ ;  $X^2 = 19,26$ ) entre la presencia de *Mycoplasma ovipneumoniae* investigado por qPCR y la presencia de otras bacterias estudiadas.

## **5.- DISCUSIÓN.**

La validación experimental del ensayo qPCR de *M. ovipneumoniae* ofrece resultados satisfactorios. Los valores estadísticos óptimos (31) que nos marcan la calidad de una reacción de qPCR son comparables a los obtenidos (figura 11). La pendiente está muy cerca del valor óptimo -3.32, de tal forma que como se esperaba, cada 10 ciclos aumentamos tres logaritmos decimales la cantidad de copias detectadas. El valor de la intersección con el eje de ordenadas es de 37,779, por lo que nuestro planteamiento de llevar la amplificación hasta 40 ciclos se considera suficiente y acertado. Además, el valor de eficiencia es de 98.129%, próximo al valor óptimo 100%.

Además como queda demostrado por los resultados obtenidos (figura 11), el control positivo diseñado y normalizado para la ocasión muestra un rango dinámico de cuantificación en el ensayo que es suficientemente amplio como para recoger todas las muestras analizadas. Tanto cepas como muestras clínicas pueden interpolarse en la recta de estándares de cuantificación elaborada, por lo tanto, queda demostrada la capacidad de cuantificación de esta técnica. Esta bondad de la técnica permitiría utilizar este ensayo de qPCR no sólo para el diagnóstico de *M. ovipneumoniae*, sino también para valorar a nivel experimental la eficacia de la aplicación de un tratamiento en concreto.

Otra característica fundamental de la técnica es la capacidad de obtener información simultánea de distintos mycoplasmas presentes en una muestra. Los cebadores y sonda de los diferentes ensayos aquí descritos se diseñaron con la finalidad de homogeneizar las temperaturas de anillamiento, y así poder verificar todas las reacciones en una misma carrera del termociclador configurando ensayos multiparamétricos.

El cultivo microbiológico se demora en dar un resultado concluyente varios días, más aún en el caso de *M. ovipneumoniae* cuyo crecimiento es lento y tedioso. Sin embargo un resultado por qPCR puede obtenerse en cuestión de horas. Por ello podemos asumir mediante qPCR el diagnóstico rutinario de estos casos de forma rápida y eficaz.

Aunque el análisis, en función de la naturaleza de las muestras, sugiere una mayor sensibilidad diagnóstica en los lavados traqueobronquiales, no se pueden sacar mayores conclusiones si tenemos en cuenta el origen del muestreo. Al no haber diseñado este trabajo bajo un programa experimental aleatorio, no se contó con ambos tipos de muestras en cada caso, impidiendo inferir conclusiones epidemiológicas.

Obviamente la situación sanitaria del animal es fundamental y siempre debemos tener en cuenta que el pulmón nos permite hacer un examen de lesiones macroscópicas y anatomopatológicas que complementa el diagnóstico de neumonía.

Como era de esperar, este ensayo de qPCR ha mostrado claramente una mayor sensibilidad diagnóstica que el cultivo microbiológico. La qPCR ha detectado como positivos 45 casos mientras que el aislamiento sólo ha tenido éxito en 14. Esto le confiere a la qPCR de *M. ovipneumoniae* una sensibilidad diagnóstica relativa 3,21 veces mayor, según los resultados de este trabajo. Todos los casos con aislamiento positivo han obtenido amplificación en la qPCR salvo dos muestras. En estos casos puntuales no se obtuvo amplificación de sus controles internos, por lo que se sospecha que el DNA no había sido extraído o conservado de la mejor manera.

Vemos pues que 31 casos se hubieran quedado sin un diagnóstico positivo de *M. ovipneumoniae* con las técnicas usuales de aislamiento microbiológico. Estos datos coinciden con los resultados de otros trabajos en los que se especula que este mycoplasma está claramente infra diagnosticado(21).

Argumentamos las siguientes razones para justificar tal diferencia de sensibilidad diagnóstica entre ambas técnicas. Por un lado, los mycoplasmas no viables presentes en las muestras no pueden ser evidenciados mediante cultivo microbiológico, mientras que si su DNA conserva cierta integridad probablemente será detectado por qPCR. Vemos aquí la primera diferencia entre ambas técnicas, mayor sensibilidad de la qPCR pero imposibilidad de diferenciar entre viables y no viables.

Por otro lado, como ha quedado reflejado en los resultados (epígrafe 4.1), la contaminación de las muestras es una clara dificultad en el aislamiento microbiológico. En 11 casos positivos a qPCR fue imposible el aislamiento de mycoplasmas por

excesiva contaminación. Esto podría explicarse por la larga incubación en cámara húmeda unido al hecho de que las necropsias en el campo no tienen las condiciones higiénicas más adecuadas. Para la técnica qPCR no influye de una manera tan crucial la presencia de DNA de otros microorganismos en la investigación de *M. ovipneumoniae*. Además gracias al diseño del ensayo en dúplex y la medida espectrofotométrica de los DNA, podemos detectar presencia de inhibidores que influirían negativamente en la eficiencia catalítica de la DNA polimerasa o irregularidades en el proceso de aislamiento de los ácidos nucleicos.

Finalmente, tal y como se describe en algunas publicaciones, se aisló simultáneamente *M. arginini* y *M. ovipneumoniae*(11,20). Se detectó DNA de *M. arginini* en 25 casos, 12 de ellos junto con DNA de *M. ovipneumoniae*. La presencia de *M. arginini* puede enmascarar el crecimiento de *M. ovipneumoniae* en el medio de cultivo. El crecimiento mucho más rápido del primero dificulta la identificación de las colonias propias del segundo, constituyendo una dificultad más en la identificación de *M. ovipneumoniae* mediante cultivo microbiológico(32). Este hecho no hace sino constatar la necesidad de desarrollar una técnica suficientemente sensible y específica como la qPCR.

Aunque el papel patógeno de *M. arginini* no es claro(20), podría considerarse como un agente agravante de la enfermedad respiratoria una vez que ésta ya se ha iniciado(33). Por ello resultaría útil diseñar un ensayo multiplex en el que ambos mycoplasmas pudieran ser detectados en una misma reacción de qPCR.

Se hallaron 22 casos (17,9%) donde tan sólo se identifican bacterias como *Pasteurella*, *Mannheimia* o *Bibersteinia*. Estos casos son claros candidatos a clasificarlos como **neumonías típicas**. Tal y como se esperaba, *Mannheimia* se encuentra con una mayor frecuencia, hasta en 17 ocasiones.

En 31 casos, 25,2% del total, se evidencia *M. ovipneumoniae* junto a *Pasteurella*, *Mannheimia* o *Bibersteinia*. Estos casos, por el contrario, deberían ser considerados como potenciales **neumonías atípicas**(11).

Los resultados estadísticos mostraron que había una asociación significativa entre las bacterias de interés estudiadas y *M. ovipneumoniae*, tanto en la detección por técnicas moleculares como por cultivo microbiológico. Este hecho podría apoyar, en cierta manera, las conclusiones de otros trabajos (11,16) que defienden que *M. ovipneumoniae* puede predisponer a los animales a una infección por otras bacterias desencadenantes de neumonía.

Finalmente, asumiendo el considerable avance que supone para el diagnóstico de estas patologías respiratorias la utilización de técnicas moleculares, una investigación anatomopatológica de los casos se antoja necesaria para confirmar el proceso neumónico. La relación establecida entre los hallazgos lesionales, los resultados moleculares y los aislamientos microbiológicos contribuirían a describir el verdadero papel de todos estos agentes etiológicos.

## **6.- CONCLUSIONES.**

El ensayo para la detección y cuantificación de *M. ovipneumoniae* ha sido diseñado y validado de forma satisfactoria. Se ha demostrado que es una herramienta más específica y más sensible que las técnicas utilizadas hasta ahora. Esta qPCR permite dar un resultado rápido y completamente fiable y por ello proponemos esta técnica para el diagnóstico rutinario de las neumonías atípicas de los pequeños rumiantes.

*M. ovipneumoniae*, *P. multocida*, *M. haemolytica* y *B. trehalosi* están sin duda presentes en los procesos neumónicos de los pequeños rumiantes. Atendiendo a la presencia de estos agentes etiológicos y sus posibles combinaciones, se han investigado un conjunto de 123 casos donde se han descrito neumonías causadas exclusivamente por mycoplasmas (8 casos), potenciales neumonías atípicas (22 casos) y neumonías típicas (31 casos).



Agradecimientos,

Este trabajo no hubiera sido posible sin la colaboración y trabajo de distintas personas. Todas ellas han sido necesarias y por ello debo agradecer y reconocer su mérito en esta investigación.

La Dra. Gema Chacón y Rosa Pueyo desarrollaron la labor de toma de muestras y necropsia de los animales remitidos al laboratorio. La Dra. Ana Fernández y Celia Sanz implementaron los cultivos de mycoplasmas y los aislamientos microbiológicos. Agradecer también el consejo de Jorge Javier Cebolla en el diseño y tratamiento *in silico* de las secuencias de DNA, las operaciones de extracción de ácidos nucleicos de Laura Pradas así como la producción de plásmidos y normalización de los controles positivos a la Dra. Elena de Tomás y Juan Daniel Serrano.

Finalmente también me gustaría citar por su labor consejera y supervisora a la Dra. Aleida Villa Espinosa, al Dr. Alfredo Ángel Benito, al Dr. Rafael Baselga y a mi tutor para este trabajo el Dr. Raúl Carlos Mainar.

**Anexo I, situación de los cebadores directo, reverso y sonda en el gen 16S rRNA del genoma de una cepa de *M. ovipneumoniae*.**

*Mycoplasma ovipneumoniae* strain GZ-WN 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.  
GenBank: JN257121.1

```

1  cgtacctaac ctacc ttttg gaccgggata accattggaa acagcggcta ataccggata
61  taataaaaaa atgcatgttt ttttatcaaa agaagccttt aaagcttcac caaaaaatgg
121  ggggtgc gcaa cattagtttag ttggtagggg aaaggcctac caagacgatg atgttttagcg
181  gggccaagag gctgtaccgc cacactggga ttgagatacg gccagactc ctacgggagg
241  cagcagtaag gaatattcca caatgagcga aagcttgatg gagcgacaca gagtgcagga
301  tgaagtcttt agggatgtaa actgctgttg taagggaaga aaaaactaga taggaaatga
361  tttagtcttg acggtacctt attagaaagt gacggcaaac tatgtgccag cagccgcggt
421  aatacatagg tcgcaagcgt tatccggaat tattgggcgt aaagcgtccg caggtttttt
481  gttaagttta aggttaaagt ctaaagctca actttagttc gctttagata ctgacaaaat
541  agaattatga agaggttagc ggaattccta gtggagcggg ggaatgcgta gatattagga
601  agaacaccaa taggcgaagg cagctaactg gtcatatatt gacactaatg gacgaaagcg
661  tgggagcaaa caggattaga taccctggta gtccacgccg taaacgatga tcattagttg
721  gtggcaaaaag tactagcac agctaacgcg ttaaatgatc cgctgagta gtatgctcgc
781  aagagtgaag cttaaaggaa ttgacgggaa cccgcacaag cgggtggagca tgtggtttaa
841  tttgaagata cgcgtagaac cttaccact cttgacatcc tcgcaaaact atagagatat
901  agcggaggct aacgagatga cagatggtgc atggttgcg tcagctcgtg tcgtgagatg
961  ttaggttaag tcctgcaacg agcgcaacc ttttcttttag ttgctaacat taagttgaga
1021 accctagaga tactgccggt gcaaaccgga ggaaggcggg gatgacgtca aatcatcatg
1081 cctcttacga gtggggcaac acacgtgcta caatggctac taaaagagc agcgaaacag
1141 tgatgtca

```

Ovip2F Primer Forward: 5'- **TTTGGACCGGGATAACCAT** – 3'  
Tm=59.83 GC%: 45 20pb

Ovip1R Primer Reverse: 5'- **CTTACTGCTGCCTCCCGTAG** – 3'  
Tm=58.55 GC%: 60 20pb

Ovip1S Sonda: 5'- **GCAACATTAGTTAGTTGGTAGGGTAAA** – 3'  
Tm=58.92 GC%: 37 27pb

Amplicón generado 235 pb

```

ttttggaccgggataaccattggaacagcggctaataccggatataataaaaaaatgcatgtttttttatcaaaaga
agcctttaaaagcttcacaaaaaaatgggggtgc gcaacattagtttagttggtagggtaaaggcctaccaagacgatga
tgtttagcggggccaagaggctgtaccgccacactgggattgagatacggcccagactc ctacgggaggcagcagtaag
g

```

**Anexo II, tabla resumida de datos obtenidos.**

				qPCR EXOPOL					Microbiología		
				ovipneumoniae		MMC	AGAL	ARGINI	bacterias		
nº ID.	Muestra	Especie	Aislam	Resultado	Cq				PAS	MAN	BIB
67505	Pul	ovino	NR	neg	N/A	NR	NR	NEG			
69139	Pul	ovino	NR	neg	N/A	NR	NR	NEG			
69677	Pul	ovino	NR	neg	N/A	NR	NR	NEG			
69699,1	Pul	ovino	SI	neg	N/A	NR	NR	NEG			
69699,2	Pul	ovino	SI	neg	N/A	NR	NR	NEG		si	
69801	Pul	caprino	NR	neg	N/A	NR	NR	NEG			
69849,1	Pul	ovino	NR	neg	N/A	NR	NEG	NEG			
69849,2	Pul	ovino	NR	neg	N/A	NR	NEG	NEG	si	si	
69849,3	Pul	ovino	NR	neg	N/A	NR	NEG	NEG			
69849,4	Pul	ovino	NR	neg	N/A	NR	NEG	NEG	si	si	
69849,5	Pul	ovino	NR	neg	N/A	NR	NEG	NEG			
70678	Pul	caprino	NO	neg	N/A	NR	NR	NEG			
71318	Lav	caprino	NR	<b>POS</b>	26	NEG	NEG	NEG			
72140	Pul	caprino	NR	neg	N/A	NR	NR	NEG			
72140	Pul	caprino	NR	neg	N/A	NR	NR	NEG			
72321	Pul	ovino	NO	neg	N/A	<b>POS</b>	NR	NEG		si	
72378	Pul	caprino	NR	<b>POS</b>	25,88	NEG	NEG	NEG		si	
76301,1	Pul	Caprino	NO	neg	N/A	NR	NR	NEG		si	
76301,2	Pul	Caprino	NO	<b>POS</b>	22,43/21,59	NEG	NEG	<b>POS</b>			
76301,3	Pul	Caprino	NO	<b>POS</b>	29,79	NEG	NEG	<b>POS</b>		si	
76302,1	Pul	Ovino	NR	neg	N/A	NR	NR	<b>POS</b>		si	
76302,2	Pul	Ovino	NR	neg	N/A	NR	NR	<b>POS</b>			
76302,3	Pul	Ovino	NR	neg	N/A	NR	NR	<b>POS</b>			
76302,4	Pul	Ovino	NR	neg	N/A	NR	NR	<b>POS</b>			
76319	Pul	Ovino	si	<b>POS</b>	37,47	NEG	NEG	NEG		si	
76361	Pul	Ovino	NO	<b>POS</b>	25,45	NEG	NEG	<b>POS</b>			
76377	Pul	Ovino	NO	neg	N/A	NR	NR	NEG		si	
76494,1	Pul	Ovino	NO	neg	N/A	NR	NR	<b>POS</b>			
76494,2	Pul	Ovino	NO	<b>POS</b>	35,85	NEG	NEG	<b>POS</b>			
76494,3	Pul	Ovino	NO	neg	N/A	NR	NR	<b>POS</b>		si	
76519	Pul	Ovino	NO	neg	N/A	NR	NR	<b>POS</b>			
76543,1	Pul	Ovino	NO	<b>POS</b>	33,06	<b>POS</b>	NEG	<b>POS</b>	si		
76543,2	Pul	ovino	NO	neg	N/A	NR	NR	<b>POS</b>			
76555	Pul	Caprino	No	neg	N/A	NR	NR	NEG			
76575	Pul	Ovino	NR	neg	N/A	NR	NR	NEG			
76578,2	Pul	ovino	NR	neg	N/A	NR	NR	NEG			si
76578,3	Pul	ovino	NR	<b>POS</b>	34,88/30,65	NEG	NEG	<b>POS</b>		si	
76589	Pul	ovino	No	neg	N/A	NR	NR	NEG	si	si	
76603	Lac	ovino	NR	<b>POS</b>		NEG	NEG	NEG	si	si	
76665	Pul	caprino	NO	neg	N/A	NR	NR	<b>POS</b>	si		

nº ID.	Muestra	Especie	Aislam	qPCR EXOPOL					Microbiología		
				ovipneumoniae		MMC	AGAL	ARGINI	bacterias		
				Resultado	Cq				PAS	MAN	BIB
76665	Pul	caprino	NO	neg	N/A	NR	NR	POS	si		
76679	Lav	ovino	no	neg	N/A	NR	NR	NEG			
76686	Pul	caprino	no	neg	N/A	NR	NR	NEG		si	
76847	Pul	caprino	NR	neg	N/A	NR	NR	NEG			
76862	Pul	caprino	NO	POS	31,68	NEG	NEG	NEG	si	si	
76874	Lav	ovino	NO	neg	N/A	NR	NR	NEG			
76893	Pul	ovino	NO	neg	N/A	NR	NR	NEG	si		
76907	Lav	ovino	NR	neg	N/A	NR	NR	POS	si		
76945	Lav	Caprino	NR	POS	27,59	NEG	NEG	POS	si	si	
76945	Lav	Caprino	NR	POS	27,63	NEG	NEG	NEG		si	
76969	Pul	ovino	NO	neg	N/A	NR	NR	POS	si	si	
76982	Pul	caprino	NR	neg	N/A	NR	NR	NEG			
76987	Pul	ovino	no	neg	N/A	NR	NR	POS			
77050	Pul	ovino	NO	neg	N/A	NR	NR	NEG			
77117	Pul	ovino	NO	POS	24,92	POS	NEG	POS	si	si	
77140	Pul	ovino	NO	neg	N/A	NR	NR	NEG			
77165	Pul	ovino	NO	neg	N/A	NR	NR	NEG		si	
77226	Pul	ovino	NO	neg	N/A	NR	NR	POS	si	si	
77309	Pul	ovino	NR	neg	N/A	NR	NR	NEG			
77320	Pul	ovino	NR	neg	N/A	NR	NR	NEG			
77320	Pul	ovino	NR	neg	N/A	NR	NR	NEG			
77322	Lav	ovino	NO	POS	20,99	NEG	neg	NEG		si	
77322	Lav	ovino	NO	POS	22,75	NEG	neg	NEG		si	
77337	Pul	ovino	NR	neg	N/A	NR	NR	NEG			
77337	Pul	ovino	NR	neg	N/A	NR	NR	NEG			
77340	Pul	caprino	NO	neg	N/A	NR	NR	NEG			
77422,1	Pul	ovino	NR	neg	N/A	NR	NR	NEG			
77422,2	Pul	ovino	NR	neg	N/A	NR	NR	NEG			
77423,1	Pul	caprino	NR	neg	N/A	NR	NR	NEG			
77423,2	Pul	caprino	NR	neg	N/A	NR	NR	NEG			
77431	Pul	ovino	NR	neg	N/A	NR	NR	NEG			
77432	Pul	ovino	NR	neg	N/A	NR	NR	NEG			
77474	Pul	ovino	NR	neg	N/A	NR	NR	NEG			
77493	Pul	caprino	NR	neg	N/A	NR	NR	NEG			
77498	Pul	ovino	NR	neg	N/A	NR	NR	NEG			
77504	Pul	ovino	NO	neg	N/A	NR	NR	NEG	si	si	
77507	Pul	ovino	NO	neg	N/A	NR	NR	NEG			
77898	Lav	caprino	NO	POS		neg	neg	neg			
77918	Pul	ovino	NO	neg	N/A	NR	NR	NEG			
77918	Lav	ovino	NO	POS		neg	neg	neg			

				qPCR EXOPOL					Microbiología		
				ovipneumoniae		MMC	AGAL	ARGINI	bacterias		
nºID.	Muestra	Especie	Aislam	Resultado	Cq				PAS	MAN	BIB
78127	Pul	ovino	SI	POS		neg	POS	neg	si		
78162	Pul	ovino	NO	neg	N/A	NR	NR	NEG			
78179	Pul	ovino	SI	POS		neg	POS	neg			
78332	Pul	ovino	NO	neg	N/A	NR	NR	NEG			
78576	Pul	caprino	SI	POS		neg	POS	neg		si	
78627	Pul	caprino	SI	POS		neg	neg	neg		si	
78631	Pul	ovino	SI	POS		neg	neg	neg	si		
78820	Lav	caprino	NO	POS		neg	neg	neg			
78956	Pul	caprino	NO	POS		neg	neg	neg		si	
78968	Pul	ovino	NO	neg	N/A	NR	NR	NEG		si	
78976	Pul	caprino	NO	neg	N/A	NR	NR	NEG		si	
79011	Pul	caprino	si	POS	30,97	neg	neg	neg		si	
79011	Lav	caprino	si	POS	27,42	neg	POS	neg		si	
79127	Pul	ovino	NO	neg	N/A	NR	NR	NEG			
79159	Pul	caprino	NO	neg	N/A	NR	NR	NEG			
79219	Pul	ovino	NO	neg	N/A	NR	NR	NEG			
79254	Pul	caprino	NO	neg	N/A	NR	NR	NEG			
79291	Pul	ovino	NO	neg	N/A	NR	NR	NEG			
79301	Pul	caprino	SI	POS	37,92	neg	neg	neg			
79315	Pul	caprino	NO	POS	30,15	neg	neg	neg			
79393	Lav	caprino	NO	POS	24	neg	POS	neg			
79411	Pul	ovino	NO	neg	N/A	NR	NR	NEG			
79584	Pul	caprino	NO	neg	N/A	NR	NR	NEG			
79639	Lav	caprino	NO	POS	23,55	neg	neg	neg		si	
79710	Pul	oveja	NO	neg	N/A	NR	NR	NEG	si		
79713	Pul	corzo	NO	neg	N/A	NR	NR	NEG			
79716	Pul	caprino	SI	POS	25,7	neg	POS	neg		si	
79723	Lav	ovino	NO	POS	35,76	neg	POS	neg			si
79767	Pul	ovino	NO	POS	27,88	neg	neg	neg	si	si	
79771	Pul	ovino	SI	POS	31,38	neg	neg	POS	si		
79830	Lav	Caprino	NO	POS	32	neg	POS	neg			
79807	Pul	ovino	NO	POS	34	neg	neg	neg		si	
79848	Pul	caprino	NO	POS	25	neg	neg	POS	si		
79849	Pul	caprino	NO	neg	N/A	NR	NR	NEG			
79864	Pul	ovino	NO	POS	23,15	neg	neg	neg			
79922	Pul	caprino	NO	POS	27	neg	neg	neg		si	
79942	Pul	ovino	NO	neg	N/A	NR	NR	NEG			
79943	Pul	ovino	NO	neg	N/A	NR	NR	NEG			
79968	Pul	ovino	NO	neg	N/A	NR	NR	NEG		si	
79973	Pul	caprino	NO	POS	25	neg	neg	neg		si	
80027	Pul	caprino	NO	POS	32,06	neg	neg	POS			

				qPCR EXOPOL					Microbiología		
				ovipneumoniae	MMC	AGAL	ARGINI		bacterias		
nº ID.	Muestra	Especie	Aislam	Resultado	Cq				PAS	MAN	BIB
80044	Pul	ovino	NO	POS	20,32	neg	neg	POS		si	
80190	Lav	caprino	SI	POS	34,98	neg	neg	neg		si	
80193	Pul	ovino	NO	POS	25	neg	neg	neg			si
78332	Pul	ovino	NO	neg	N/A	NR	NR	NEG			
78576	Pul	caprino	SI	POS		neg	POS	neg		si	

**Leyenda** de la tabla resumida de datos:

- **nº ID.:** Número de identificación interna del laboratorio EXOPOL.
- **Muestra:** naturaleza de la muestra analizada, *Pul* en caso de pulmones o *Lav* en el caso de lavados traqueobronquiales.
- **Aislam:** Aislamiento microbiológico de *M. ovipneumoniae*.
- **Cq:** valor del ciclo obtenido en la amplificación de *M. ovipneumoniae* Real Time PCR.
- **MMC:** Resultado de qPCR para *M. mycoides cluster*.
- **AGAL:** Resultado de qPCR para *M. agalactiae*.
- **ARGININI:** Resultado de qPCR para *M. arginini*.
- **PAS:** Aislamiento microbiológico de *Pasteurella multocida*.
- **MAN:** Aislamiento microbiológico de *Mannheimia haemolytica*.
- **BIB:** Aislamiento microbiológico de *Bibersteinia trehalosi*.

**Anexo III, Pruebas bioquímicas para la identificación de los aislamientos microbiológicos.**

Para la identificación de *Pasteurella*, *Mannheimia* o *Bibersteinia* se realizó la siguiente batería de pruebas bioquímicas(34):

1. **Catalasa:** peróxido de hidrógeno (Panreac) al 33% peso/volumen.
2. **Oxidasa:** tetrametil-p-fenilendiamina (Sigma) al 1% peso/volumen
3. **Urea:** Caldo urea (Oxoid) y Urea (Panreac) al 40% peso/volumen
4. **Indol:** 4-dimethylamino cinnamaldehído al 1% peso/volumen
5. **Simmonds Citrato:** Simmons Citrato agar (Oxoid) preparado según instrucciones del fabricantes
6. **TSI (agar hierro triple azúcar):** TSI agar (Oxoid) preparado según instrucciones del fabricantes
7. **Trehalosa:** Medio preparado por caldo rojo fenol (BBL Phenol Red Broth Base 211506) a razón de 1.35 g / 100 mL y Trehalosa (Sigma T-5251) 1 g / 100mL.

Adicionalmente, para observar la morfología de las bacterias aisladas se prepara una **tinción de Gram:** Cristal violeta (Panreac) 2%, Oxalato de amonio (Panreac) 10%, Iodo crudo (Panreac) 1%, Yoduro potásico (Panreac) 2%, Safranina (Panreac) 0.5%.

## **7.- BIBLIOGRAFÍA.**

- (1) Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Gobierno de España. RESULTADO DE LAS ENCUESTAS DE GANADO OVINO Y CAPRINO DE NOVIEMBRE DE 2012 . Available at: [http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/Informe\\_de\\_Ovino-Caprino\\_2012\\_tcm7-286211.pdf](http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/Informe_de_Ovino-Caprino_2012_tcm7-286211.pdf), 2012.
- (2) Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Gobierno de España. CARACTERIZACIÓN DEL SECTOR OVINO Y CAPRINO EN ESPAÑA. AÑO 2009. Available at: [http://www.magrama.gob.es/app/vocwai/documentos/Adjuntos\\_AreaPublica/Caracterizaci%C3%B3n%20del%20sector%20ovino%20y%20caprino%20en%20Espana%C3%B1a.pdf](http://www.magrama.gob.es/app/vocwai/documentos/Adjuntos_AreaPublica/Caracterizaci%C3%B3n%20del%20sector%20ovino%20y%20caprino%20en%20Espana%C3%B1a.pdf), 2009.
- (3) Mycoplasma protocols. Totowa, New Jersey: Humana Press; 1998.
- (4) Yang F, Tang C, Wang Y, Zhang H, Yue H. Genome Sequence of Mycoplasma ovipneumoniae Strain SC01. J Bacteriol 2011 SEP 2011;193(18):5018-5018.
- (5) Martin WB. Respiratory infections of sheep. Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases 1996 JUN 1996;19(3):171-179.
- (6) Brogden KA, Rose D, Cutlip RC, Lehmkuhl HD, Tully JG. Isolation and Identification of Mycoplasmas from the Nasal Cavity of Sheep. Am J Vet Res 1988 OCT 1988;49(10):1669-1672.
- (7) Adehan RK, Ajuwape ATP, Adetosoye AI, Alaka OO. Characterization of Mycoplasmas isolated from pneumonic lungs of sheep and goats. Small Ruminant Research 2006 MAY 2006;63(1-2):44-49.
- (8) Alley MR, Quinlan JR, Clarke JK. The prevalence of Mycoplasma ovipneumoniae and Mycoplasma arginini in the respiratory tract of sheep. N Z Vet J 1975 1975-Jul;23(7):137-41.
- (9) Jones GE, Gilmour JS, Rae AG. The Effects of Different Strains of Mycoplasma-Ovipneumoniae on Specific Pathogen-Free and Conventionally-Reared Lambs. J Comp Pathol 1982 1982;92(2):267-272.
- (10) Niang M, Rosenbusch RF, LopezVirella J, Kaeberle ML. Expression of functions by normal sheep alveolar macrophages and their alteration by interaction with Mycoplasma ovipneumoniae. Vet Microbiol 1997 OCT 31 1997;58(1):31-43.
- (11) Nicholas RAJ, Ayling RD, Loria GR. Ovine mycoplasmal infections. Small Ruminant Research 2008 APR 2008;76(1-2):92-98.



(12) Alley MR, Ionas G, Clarke JK. Chronic non-progressive pneumonia of sheep in New Zealand - a review of the role of *Mycoplasma ovipneumoniae*. N Z Vet J 1999 OCT 1999;47(5):155-160.

(13) Ionas G, Norman NG, Clarke JK, Marshall RB. A Study of the Heterogeneity of Isolates of *Mycoplasma-Ovipneumoniae* from Sheep in New-Zealand. Vet Microbiol 1991 NOV 1991;29(3-4):339-347.

(14) Niang M, Rosenbusch RF, Andrews JJ, Kaeberle ML. Demonstration of a capsule on *Mycoplasma ovipneumoniae*. Am J Vet Res 1998 MAY 1998;59(5):557-562.

(15) Lacasta D, Ferrer LM, Ramos JJ, Gonzalez JM, De las Heras M. Influence of climatic factors on the development of pneumonia in lambs. Small Ruminant Research 2008 NOV 2008;80(1-3):28-32.

(16) Dassanayake RP, Shanthalingam S, Herndon CN, Subramaniam R, Lawrence PK, Bavananthasivam J, et al. *Mycoplasma ovipneumoniae* can predispose bighorn sheep to fatal *Mannheimia haemolytica* pneumonia. Vet Microbiol 2010 OCT 26 2010;145(3-4):354-359.

(17) Ionas G, Mew AJ, Alley MR, Clarke JK, Robinson AJ, Marshall RB. Colonization of the Respiratory-Tract of Lambs by Strains of *Mycoplasma-Ovipneumoniae*. Vet Microbiol 1985 DEC 1985;10(6):533-539.

(18) Ayling RD, McAuliffe L, Nicholas RAJ. 70. *Mycoplasma ovipneumoniae*: a re-emerging pathogen of sheep and the development of improved diagnostic tests. Res Vet Sci 2003;74, Supplement 1(0):24.

(19) Goncalves R, Mariano I, Nunez A, Branco S, Fairfoul G, Nicholas R. Atypical non-progressive pneumonia in goats. Veterinary Journal 2010 FEB 2010;183(2):219-221.

(20) Lin Y-, Miles RJ, Nicholas RAJ, Kelly DP, Wood AP. Isolation and immunological detection of *Mycoplasma ovipneumoniae* in sheep with atypical pneumonia, and lack of a role for *Mycoplasma arginini*. Res Vet Sci 2008 JUN 2008;84(3):367-373.

(21) Miller DS, Weiser GC, Aune K, Roeder B, Atkinson M, Anderson N, et al. Shared Bacterial and Viral Respiratory Agents in Bighorn Sheep (*Ovis canadensis*), Domestic Sheep (*Ovis aries*), and Goats (*Capra hircus*) in Montana. Veterinary medicine international 2011 2011;2011:162520-162520.

(22) Bascunana CR, Mattsson JG, Bolske G, Johansson KE. Characterization of the 16s Ribosomal-Rna Genes from *Mycoplasma* Sp Strain F38 and Development of an Identification System Based on Pcr. J Bacteriol 1994 MAY 1994;176(9):2577-2586.

(23) Vankuppeveld FJM, Vanderlogt JTM, Angulo AF, Vanzoest MJ, Quint WGV, Niesters HGM, et al. Genus-Species and Species-Specific Identification

of Mycoplasmas by 16s Ribosomal-Rna Amplification (Applied Environmental Microbiology, Vol 58, Pg 2606, 1992). Appl Environ Microbiol 1993 FEB 1993;59(2):655-655.

(24) Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16s Ribosomal Dna Amplification for Phylogenetic Study. J Bacteriol 1991 JAN 1991;173(2):697-703.

(25) Li M, Ma CJ, Liu XM, Zhao D, Xu QC, Wang YJ. Molecular cloning of HSP70 in *Mycoplasma ovipneumoniae* and comparison with that of other mycoplasmas. Genetics and Molecular Research 2011 2011;10(2):834-848.

(26) Besser TE, Cassirer EF, Potter KA, VanderSchalie J, Fischer A, Knowles DP, et al. Association of *Mycoplasma ovipneumoniae* infection with population-limiting respiratory disease in free-ranging rocky mountain bighorn sheep (*Ovis canadensis canadensis*). J Clin Microbiol 2008 FEB 2008;46(2):423-430.

(27) Fernández A. CG. Aislamiento de mycoplasmas en leche y pulmones de pequeños rumiantes. . Albéitar 2007;III:52.

(28) Benito A, Arnal J, de Tomas E, Serrano J, Villa A, editors. Endogenous control for reliable results in Real Time PCR assays. WAVLD congress Berlin (Germany); 2013.

(29) Villa A, de Tomás E, Benito A, Arnal J, Serrano J, editors. Evaluation of cloned genes as quantitative controls in Real Time PCR assays for infectious diseases with veterinary importance. SEEBBM congress Seville (Spain); 2012.

(30) Villa A. Fernández A. Arnal JL. Serrano JD. Chacón G. Benito AA. Baselga R., editor. Desarrollo y validación de una ZEN Real Time PCR gel mix para la detección y cuantificación del gen (mp81) de *Mycoplasma agalactiae*. Tenerife; 2011.

(31) Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN. Statistical analysis of real-time PCR data. BMC Bioinformatics 2006 FEB 22 2006;7:85.

(32) Weiser GC, Drew ML, Cassirer EF, Ward ACS. Detection of *Mycoplasma ovipneumoniae* and *M. arginini* in Bighorn Sheep Using Enrichment Culture Coupled with Genus- and Species-Specific Polymerase Chain Reaction. J Wildl Dis 2012 APR 2012;48(2):449-453.

(33) Azizi S, Tajbakhsh E, Rezaii A, Nekouei S, Namjoo AR. The role of *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Mycoplasma arginini* in pneumonic lungs of slaughtered sheep. Rev Med Vet 2011 JUN 2011;162(6):310-315.

(34) P.J. Quinn, M.E. Carter, B. Markey, G.R. Carter. Clinical Veterinary Microbiology. : Mosby; 2000.

(35) Pettersson B, Johansson KE, Uhlen M. Sequence-Analysis of 16s Ribosomal-Rna from Mycoplasmas by Direct Solid-Phase Dna-Sequencing. Appl Environ Microbiol 1994 JUL 1994;60(7):2456-2461.