

Detección en la conjuntiva y el oído externo de especies potencialmente patógenas del género *Mycoplasma* en ovinos

Detection of potentially pathogenic species of the genus *Mycoplasma* in the conjunctiva and external ear of sheep

Gaeta N.C.¹ 0000-0001-6397-605X

Alemán M.A.R.¹ 0000-0002-5687-7763

Timenetsky J.² 0000-0002-1344-3906

Gregory L.¹ 0000-0003-0240-3025

¹ Department of Internal Medicine. School of Veterinary Medicine and Animal Sciences. University of São Paulo, São Paulo. Brazil. Email: natalia.gaeta@hotmail.com

² Laboratory of Mycoplasmas. Department of Microbiology. Institute of Biomedical Sciences. University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Veterinaria (Montevideo) Volumen 57
Nº 216 (2021 Jul - Dic) e20215721601

DOI:10.29155/VET.57.216.1

Recibido: 21/11/2020
Aceptado: 28/05/2021

Resumen

Los micoplasmas son responsables de varias infecciones en pequeños rumiantes. En Brasil se han detectado micoplasmas potencialmente patógenas en el conducto auditivo externo sano de caprinos y bovinos y en asociación con ácaros, pero nunca se han detectado en ovinos. La presente investigación tuvo como objetivo evaluar la conjuntiva y el oído externo como fuente de infección silenciosa de micoplasmas en ovinos. Se obtuvieron muestras de frotis del conducto auditivo externo y ocular de cuarenta y cinco ovinos (machos y hembras). Fueron realizadas las pruebas de Detección molecular (PCR) y aislamiento de *Mycoplasma* spp. Se determinó la concentración mínima inhibitoria para el aislamiento, utilizando oxitetraciclina, cloranfenicol, tilosina y ácido nalidixico. Fue aislado *Mycoplasma conjunctivae* a partir de la conjuntiva ocular de un ovino sano, además de la detección molecular de *M. agalactiae* y *M. mycoides* subsp. *capri* en ambos sitios anatómicos de ovinos del Estado de São Paulo, Brasil. El análisis filogenético reveló proximidad y similitud con un aislado de ovino y de cabra estadounidenses. La conjuntiva ocular y el oído externo de los ovinos son sitios anatómicos que pueden portar micoplasmas patógenos provocando infecciones a ovinos vulnerables.

Palabras clave: Mollicutes, *Mycoplasma conjunctivae*, Concentración inhibitoria mínima, Ovinos.

Abstract

Mycoplasmas are responsible for several infections in small ruminants. Potentially pathogenic mycoplasmas have already been detected in the external ear canal of Brazilian healthy goats and cattle, and in association with mites, but not in sheep. The present research aimed to evaluate the role of the conjunctiva and external ear as a silent source of micoplasmas in sheep. Ocular and external ear canal swab samples were obtained from forty-five male and female sheep. Molecular detection (PCR) and isolation of *Mycoplasma* spp. were performed. Minimum inhibitory concentration was performed using oxytetracycline, tylosin, chloramphenicol and nalidixic acid. We describe the isolation of *Mycoplasma conjunctivae* from the ocular conjunctivae of a healthy sheep, besides the molecular detection of *M. agalactiae* and *M. mycoides* subsp. *capri* in both anatomical sites in sheep from the State of São Paulo. Phylogenetic analysis revealed proximity and similarity with an American sheep and goat isolates. The ocular conjunctiva and the external ear of sheep are keepers of potentially pathogenic veterinary mycoplasmas which can infect vulnerable sheep.

Keywords: Mollicutes, *Mycoplasma conjunctivae*, Minimum inhibitory concentration, Sheep.

Introducción

Los micoplasmas son bacterias pleiomórficas consideradas como los organismos más pequeños capaces de reproducirse (Razin y Hayflick, 2010; Tortora et al., 2012). Suelen ser anaerobios facultativos, pero algunas especies pueden sobrevivir en microaerofilia con una concentración de CO₂ entre el 5 y el 10% (Quinn et al., 2005). Pertenecen a la clase Mollicutes y son reconocidos por no tener pared celular y por la gran cantidad de hospedadores, pudiendo parasitar mamíferos, reptiles, peces, artrópodos y plantas (Razin y Hayflick, 2010).

Los micoplasmas son causantes de enfermedades en pequeños rumiantes. *M. mycoides* subsp. *capri*. puede ser uno de los agentes causantes de la pleumonia contagiosa caprina (PCC), además de ocasionar conjuntivitis, mastitis y artritis en caprinos, se ha detectado en ovinos (Shahet et al., 2017). *M. agalactiae* es el agente etiológico de la agalactia contagiosa (OIE, 2013), enfermedad con notificación obligatoria que se ha detectado en Brasil, especialmente en la región noreste (Alves et al., 2013; Azevedo et al., 2006; Peixoto et al., 2018). *M. conjunctivae* es un agente conocido por ocasionar queratoconjuntivitis infecciosa (Van Halderenet et al., 1994, Fernández-Aguilar et al., 2013) y en Brasil se aisló por primera vez en el estado de São Paulo (Gregory et al., 2003). *M. conjunctivae* se detectó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en ovinos sanos y ovinos con conjuntivitis en el estado de Pernambuco, Brasil (Almeida Neto et al., 2004). Otras especies como *M. capricolum* subsp. *capricolum* y *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* (este último como causante de la pleuroneumonía caprina infecciosa) se han descrito en varios países (Awanet et al., 2009; Kumar et al., 2011). Sin embargo, en Brasil, estos micoplasmas han sido inofensivos para los rebaños de ovinos.

Los micoplasmas suelen ser específicos de una especie (Whitford et al., 1994) y generalmente suelen estar presentes en sitios anatómicos específicos de cada infección. Sin embargo, ya se han detectado muchas especies en diferentes tejidos (Santos et al., 2009; Aguilar et al., 2019), lo que indica el papel de estos sitios como reservorios de estas bacterias en los rebaños. Se han detectado micoplasmas en el oído externo de rebaños caprinos y bovinos brasileños (Pereira et al., 2003; Santos et al., 2009), pero estas bacterias no se han estudiado en ovinos. Por esta razón, debemos de entender importancia económica de *Mycoplasma* spp. en la cría de ovinos. Este estudio tuvo como objetivo detectar estos microorganismos y su relevancia en la conjuntiva ocular y en el oído externo de ovinos sanos y neumónicos.

Materiales y métodos

El presente trabajo fue realizado de acuerdo con los principios éticos de la investigación animal adoptados por el Comité de Ética para el uso de animales de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Sao Paulo (#Protocolo 1740110219).

Se estudiaron cuarenta y cinco ovinos machos y hembras, de tres

granjas de cría semi-intensivas (N = 33ovinos) y del Hospital para Bovinos y Pequeños Ruminantes de la Facultad de Medicina Veterinaria y Ciencia Animal, Universidad de São Paulo (N = 12ovinos). Los ovinos fueron seleccionados al azar. Los animales no mostraron signos clínicos de conjuntivitis y / u otitis, pero fueron caracterizados como sanos y neumónicos, conforme descrito por Franco et al. (2019). En el examen físico se evaluaron parámetros vitales (frecuencia respiratoria, frecuencia cardíaca, temperatura rectal y movimientos ruminales) y las vías respiratorias inferiores y superiores. Se consideró que los ovinos neumónicos tenían al menos dos de los siguientes parámetros: frecuencia respiratoria superior a los 30 movimientos respiratorios por minuto, tos, temperatura rectal superior a 40 ° C y sonido anormal en auscultación torácica.

Las muestras de hisopos o con cotonetes se obtuvieron del oído externo (derecho e izquierdo) girándolos dentro durante 30-45 segundos y las muestras de la conjuntiva ocular (derecha e izquierda) se obtuvieron por frotación da conjuntiva ocular. Inmediatamente a la salida del conducto auditivo y ocular respectivamente, los hisopos se colocaron en un medio de transporte que contenía sacarosa, fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio dibásico, suero de caballo, acetato de talio y penicilina. Estas muestras se almacenaron en nitrógeno líquido.

El cultivo y el aislamiento de micoplasmas se realizó en agar y caldo SP-4 (Tully, 1995), como se describe: las muestras fueran homogeneizadas vigorosamente y se filtraron inicialmente con filtros estériles de 0,45 µm (Kasvi, Paraná, Brasil). Se agregaron doscientos microlitros de cada muestra filtrada a 1800 µl de caldo SP-4 y se sembraron 100 µl de cada muestra filtrada en agar SP-4. Se incubaron tubos y placas a 35±2 ° C en anaerobiosis con 5% de CO₂ y fueron observadas durante quince días. La caracterización de micoplasmas en el ágar ocurrió por la producción de colonias típicas de “huevo frito”, fermentación de glucosa y / o hidrólisis de arginina. En los tubos, la presencia de micoplasma se caracterizó por ausencia de turbidez y fermentación de glucosa y / o hidrólisis de arginina (Brown et al., 2010).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó para la detección molecular de *Mycoplasma* spp. directamente en las muestras, así como para la confirmación de las colonias aisladas. La extracción de ADN se realizó como lo describen Boomet et al., (1990) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó logrado inicialmente para detectar microorganismos de micoplasmas utilizando los *primers* MGS0 (5'-TGCACCATC-TGTCCTCTGTAAACCTC-3') y GP03 (5'-GGGAGCAAA-CAGGATTAGATACCCT-3) (van Kuppeveld et al., 1992). Las muestras positivas se volvieron a analizar para detectar *M. agalactiae* (MagF: 5'-CCT TTT AGA TTG GGA TAG CGG ATG - 3' / MagR: 5'- CCG TCA AGG TAG CGT CAT TTC CTA C - 3') (Chávez-Gonzales et al., 1995), *M. mycoides* subsp. *capri* (MMMLC2-L: 5'-GATTAACTTCTCATGCAAC-3' / MMMLC2-R: 5'-AAGTAAAATGAAAGAATTTTA-3'[1], y *M. conjunctivae* (McoF1: 5'- GTATCTTTAGAGTCTCTGCTTT-CAC-3 / Mco1: 51- CAGCGTGCAGGATGAAATCCCTC-3') (Giacometti et al., 1999).

Se realizó una prueba de concentración mínima inhibitoria para colonias aisladas según Hannan, (2003). Los aislamientos fueron

confrontados a los siguientes fármacos oxitetraciclina, tilosina, cloranfenicol y ácido nalidixico, disponibles en el laboratorio y que se utilizan a menudo contra la enfermedad micoplasmosis. El análisis filogenético se realizó utilizando una secuencia parcial del gen 16S rRNA (van Kuppeveld et al., 1992) de los aislamientos obtenidos. Los productos de PCR fueron purificados por Exosap-IT (GE) siguiendo las instrucciones del fabricante. El kit de secuenciación Big Dyeterminator v.3.0 (Life) y el kit de purificación X-terminator (Life) se utilizaron durante el protocolo de secuenciación de ADN. Las muestras se colocaron en el secuenciador de ADN automatizado ABI 3130 (ABI). Las secuencias fueron editadas y alineadas en el software BioEdit 7 Sequence Alignment Editor. Las secuencias de nucleótidos se analizaron en MEGA X (Kumar et al., 2018). Se seleccionó el método de unión de vecinos para la reconstrucción filogenética de las secuencias de micoplasma con el método de Tamura-Neicomo modelo de sustitución (Tamura y Nei, 1993), y 10 000 *bootstrops* para el cálculo de estimaciones de filogenia. El porcentaje de similitud y la distancia genética se realizó con secuencias detectadas en este estudio y otros aislamientos pertenecientes a la misma especie. Los números de acceso de GenBank de las secuencias utilizadas se describen en la tabla 1.

La asociación entre la detección molecular de micoplasmas y la enfermedad respiratoria de los ovinos se evaluó mediante la prueba de Chi-Cuadrado de Pearson o la Prueba

Exacta de Fisher. La significancia fue dada por $P < 0,05$. Los cálculos se realizaron en SPSS v. 25.0 (IBM, Estados Unidos).

Resultados

Se detectaron micoplasmas molecularmente en las muestras de conducto auditivo externo (32,2%; 29/90) y conjuntiva (26,7%; 24/90). De las muestras positivas a micoplasmas, *M. agalactiae* solo se detectó en la conjuntiva (16,7%; 04/24). *M. conjunctivae* y *M. mycoides* subsp. *capri* se detectaron en el canal auditivo externo (3,4% (01/29); 10,3% (3/29), respectivamente) y la conjuntiva (12,5% (03/24); 4,2% (01/24), respectivamente). Entre las muestras positivas a micoplasmas, el 86,2% (25/29) del oído externo y el 66,7% (16/24) de la conjuntiva ocular no tenían las especies determinadas por los *primers* aquí utilizados.

En cuanto a la enfermedad respiratoria, seis ovinos se consideraron neumónicos y 39 sanos. *M. agalactiae* se detectó solo en la conjuntiva ocular de ovinos sanos, mientras que *M. capri* se detectó solo en el canal auditivo de animales enfermos. *M. conjunctivae* se detectó en ambos sitios anatómicos de los dos grupos (Tabla 2). No hubo asociación entre la detección molecular de micoplasmas y la enfermedad respiratoria ovina.

Tabla 1: Números de acceso de GenBank utilizados en el análisis genético.

Genbank	Microorganismos	Referencia
DQ156346	<i>M. conjunctivae</i>	Jansen et al. 2006
DQ156347	<i>M. conjunctivae</i>	Jansen et al. 2006,
NR074135	<i>M. conjunctivae</i>	Calderon-Copete et al. 2008
FJ226571	<i>M. conjunctivae</i>	Volokhov et al. 2012
NR044781	<i>M. conjunctivae</i>	Pettersson, Uhlen, Johansson, 1996.
NR041743	<i>M. arginini</i>	Pettersson et al., (2000)
NR044667	<i>M. agalactiae</i>	Weisburg et al., (1989)
NR102850	<i>M. bovis</i>	Wise et al. (2011)
D78650	<i>U. diversum</i>	Harasawa y Cassell (1996)
NR113686	<i>M. hyorhinis</i>	Nakagawa et al. (2011) - Unpublished
NR121731	<i>M. bovoculi</i>	Calcutt and Foecking (2014)
NR025182	<i>M. dispar</i>	Johansson and Pettersson (2008) - Unpublished

Tabla 2. No existe asociación entre la detección de micoplasmas en el conducto auditivo externo o conjuntiva ocular y enfermedad respiratoria ovina. Los resultados se dieron en relación con el número de animales estudiados (N = 45) y se expresaron como % (N / T), siendo N el número de animales positivos y T el número total de animales. Los valores de P se obtuvieron mediante la prueba de Chi-Cuadrado de Pearson o la prueba exacta de Fischer, con significancia cuando $P < 0,05$.

Microorganismo	Neumónico	Saludable	P-valor	Neumónico	Saludable	P-valor
	Conducto auditivo			Conjuntivaocular		
Mollicutes	50,0 (03/06)	41,0 (16/39)	0,697	50,0 (03/06)	48,7 (19/39)	1,000
<i>M. agalactiae</i>	00,0 (00/06)	00,0 (00/39)	-	33,3 (02/06)	05,1 (02/39)	1,000
<i>M. capri</i>	02,6 (01/06)	00,0 (00/39)	0,252	00,0 (00/06)	00,0 (00/39)	0,140
<i>M. conjunctivae</i>	00,0 (00/06)	02,6 (01/39)	0,692	16,7 (01/06)	2,6 (01/39)	0,262
Indeterminado	33,3 (02/06)	38,4 (15/39)	1,000	50,0 (03/06)	41,0 (16/39)	0,683

Se aislaron colonias de “huevos fritos” fermentadores de glucosa de la conjuntiva de un ovino sano del hospital veterinario universitario. El método de PCR confirmó estas colonias como *Mycoplasma conjunctivae* (denominada como cepa SP317). Se extrajo el ADN y se secuenció una secuencia parcial del gen del ARNr 16S (número de acceso de Genbank: MK656520). El análisis filogenético reveló proximidad (1,1) y similitud (98.8%) con aislado de *M. conjunctivae* de ovino y de cabra de los Estados Unidos (tabla3), confirmando los resultados observados en el árbol filogenético (Figura 1).

El alineamiento de las secuencias de nucleótidos mostró diferencias en los últimos nucleótidos (Figura 2).

Se determinó la concentración mínima inhibitoria para el aislado de *M. conjunctivae*, utilizando cuatro antibióticos. La CMI fue 0,5 µg / ml para oxitetraciclina, 4 µg / ml para cloranfenicol, 0,5 µg / ml para tilosina y 32 µg / ml para ácido nalidixico.

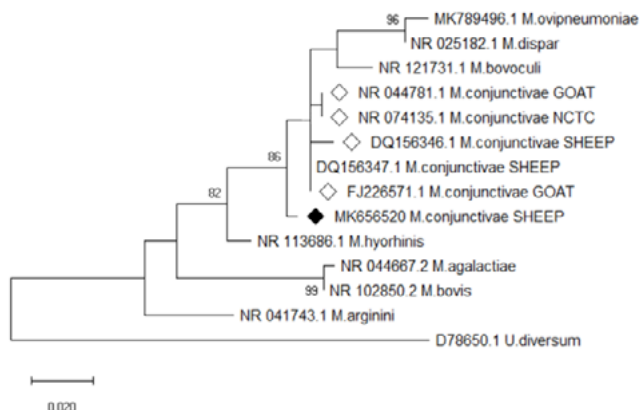


Figura 1: Árbol filogenético que demuestra la relación entre un aislado de *Mycoplasma conjunctivae* de la mucosa ocular de una ovino del estado de São Paulo, Brasil, y otros aislamientos de ovinos y caprinos.

Nota: La muestra con un diamante negro indica el aislado obtenido en la presente investigación. Las muestras con un diamante blanco indican aislamientos de *M. conjunctivae*.

El árbol filogenético se infirió utilizando el método de máxima verosimilitud y el modelo de Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993). Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA X (Kumar et al., 2018).

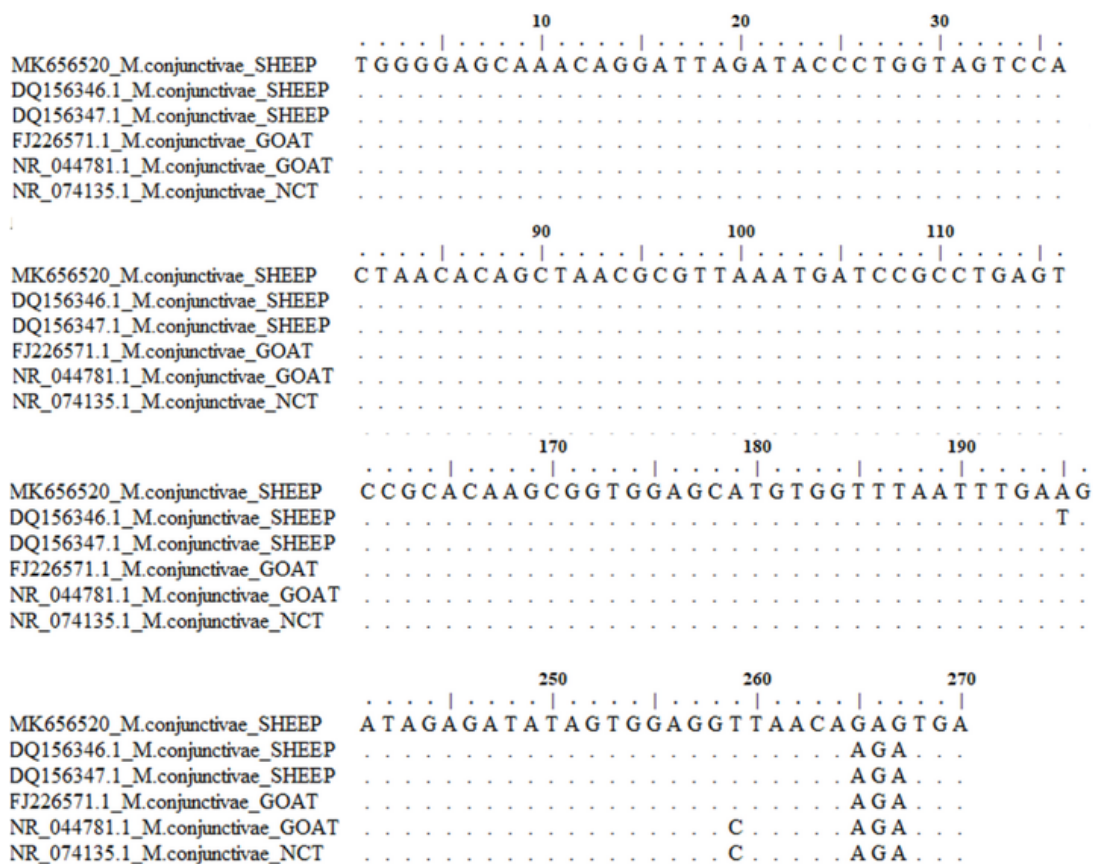


Figura 2: Alineamiento de secuencias de nucleótidos del gen de ARNr 16S (secuencia parcial) de *M. conjunctivae* de un ovino brasileño (MK656520) y otros aislados de ovino (NR044781, DQ156346, DQ156347, NR074135) y de cabra (FJ226571). Los puntos indican identidad con la cepa MK656520.

Tabla3. Estimaciones de divergencia evolutiva y porcentaje de similitud entre el aislado brasileño y otras secuencias de *Mycoplasma conjunctivae*.

Secuencias	MK656520	DQ156346	DQ156347	FJ226571	NR044781	NR074135
MK656520	***	98.0	98.8	98.8	98.4	98.4
DQ156346	1.9	***	99.2	99.2	98.8	98.8
DQ156347	1.1	0.7	***	1.0	99.6	99.6
FJ226571	1.1	0.7	0.0	***	99.6	99.6
NR044781	1.5	1.1	0.3	0.3	***	1.0
NR074135	1.5	1.1	0.3	0.3	0.0	***

El triángulo superior indica el porcentaje de similitud. El triángulo inferior indica las distancias genéticas. Los valores en negrita indican los resultados de las secuencias de este estudio en relación con secuencia USP. A = DQ156346 (*Mycoplasma conjunctivae* sheep USA); B = DQ156347 (*Mycoplasma conjunctivae* sheep USA); C = FJ226571 (*Mycoplasma conjunctivae* goat USA); = NR044781 (*Mycoplasma conjunctivae* Goat); E=NR074135 (*Mycoplasma conjunctivae* HRC/583)

Discusión

Se estudió la presencia de micoplasmas potencialmente patógenos en el conducto auditivo externo y en la conjuntiva de ovinos sanos y con enfermedad respiratoria. Se detectaron molecularmente especies importantes en los dos sitios anatómicos de ambos grupos de ovinos, además del aislamiento de *M. conjunctivae* de un ovino sano. Los resultados indican que el canal auditivo y la conjuntiva son importantes reservorios de micoplasmas y posibles puntos de entrada silenciosos para enfermedades en el rebaño.

La presencia de micoplasmas potencialmente patógenos en rumiantes como bovinos y caprinos es recurrentemente mencionada en la literatura (DaMassa, 1983; Mercier et al., 2007; Amores et al., 2010) por lo que en ovinos no son mencionados. En este trabajo, fueron detectadas por la técnica laboratorial de PCR las especies *M. mycoides* subsp. *capri* y *M. agalactiae*, patógenos bien conocidos de la agalaxia contagiosa (Scott, 2011). Estos microorganismos se han identificado en los sitios auriculares y oculares de bovinos brasileños (Pereira et al., 2003) y caprinos y ovinos de otros países (Mothaet al., 2003), siendo en este presente estudio la primera identificación en ovinos brasileños. Estas especies pueden causar enfermedades respiratorias en pequeños rumiantes (Scott, 2011). Aunque estos microorganismos se han identificado en la conjuntiva ocular y el conducto auditivo externo de ovinos neumónicos, la asociación de la presencia de estos agentes y la enfermedad respiratoria de los ovinos no fue significativa en este estudio. Cabe mencionar que la evaluación de los agentes causales de enfermedad respiratoria está fuera del alcance del presente trabajo y que ningún ovino mostró signos clínicos de agalaxia contagiosa, pero la detección de ambos microorganismos debe tratarse con precaución.

La mayoría de las muestras positivas para micoplasma no se han confirmado su especie y es probable que otras especies podrían estar presentes en ambos sitios anatómicos. De hecho, *M. putrefaciens*, *M. alkalensis*, *M. arginini*, *M. bovirhinis* (Pereira et al., 2003) y *M. bovoculi* ya se han detectado en el oído

externo de pequeños rumiantes y bovinos, y para conocer todos los agentes presentes en el conducto auditivo y en la conjuntiva, el estudio del microbiota debe realizarse mediante la secuenciación de una nueva generación.

M. conjunctivae es el agente etiológico de la queratoconjuntivitis infecciosa (Van Halderenet al., 1994) y en este trabajo se identificó tanto en la conjuntiva como en el canal auditivo de animales sin esta infección ocular, indicando la posible participación de otros sitios anatómicos además de los ojos como reservorios de este microorganismo en los rebaños. Aguilar et al., (2019) estudiaron el papel de diferentes sitios anatómicos en la transmisión y preservación de *M. conjunctivae* en rebaños de caprinos y verificaron que el conducto auditivo es uno de los sitios anatómicos con mayor persistencia de este agente. Ya se ha descrito la persistencia de *M. conjunctivae* en la población de pequeños rumiantes tras un brote de queratoconjuntivitis (Fernández-Aguilar et al., 2017) y se cree que los mecanismos de evasión del sistema inmunológico, como mutaciones en proteínas de superficie, son responsable de esta persistencia (Rosengartenet al., 2000).

En la presente investigación, un ovino sano del hospital veterinario portaba *M. conjunctivae* en la conjuntiva que fue aislado y cultivado en el laboratorio. El entorno hospitalario puede presentar condiciones en las que favorece una salud más frágil y con mayor estrés. Las situaciones que generan estrés como enfermedades, transporte, vacunación y destete son predisponentes a infecciones oportunistas, como la micoplasmosis.

El análisis filogenético mostró que el aislado brasileño fue cercano genéticamente a un aislado estadounidense de un ovino y de una cabra, este hallazgo puede ser explicado por las relaciones comerciales entre estos países. Describiendo nuestros valores de CMI para tilosina y oxitetraciclina se pudo observar que eran inferiores a los descritos por Egbu, (1992), lo que indica que las infecciones por el agente aislado aún se pueden tratar con éxito, inclusive si se ha aislado en un entorno hospitalario, donde estos dos principios activos se utilizan ampliamente en la clínica de rumiantes.

Conclusiones

La detección y aislamiento de importantes especies de micoplasmas tanto en el conducto auditivo externo como en la conjuntiva de ovinos indica el posible papel de estos sitios anatómicos en el mantenimiento de estos microorganismos en el rebaño. La proximidad genética entre *M. conjunctivae* aislado en Brasil y en de los Estados Unidos indica una posible ruta para la introducción de estos microorganismos. Incluso con la ausencia de una asociación entre la presencia de estas bacterias y la enfermedad respiratoria, los resultados de este documento amplían las alertas a los médicos y epidemiólogos sobre una posible fuente silenciosa de estos microorganismos en los rebaños (en particular, en los entornos de corrales de engorda) y en los sitios hospitalarios donde los animales están más predispuestos a la infección. Hasta donde sabemos, esta es la primera investigación para estudiar la susceptibilidad antimicrobiana de aislados de *M. conjunctivae* de ovinos brasileños. Se necesita más investigación para determinar una descripción más detallada del perfil de susceptibilidad a los antibióticos de *M. conjunctivae* en Brasil.

Agradecimientos

Los autores agradecen todos los colaboradores de este estudio, especialmente al Dr. Mario Balara por su valiosa ayuda durante la recolección de muestras, al Dr. Luciano M. Thomazelli por su apoyo en la secuenciación de Sanger y a la Coordinación para el Mejoramiento del Personal de Educación Superior (CAPES) por el apoyo. N.C.G recibió una beca de la Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo (São Paulo Research Foundation – grant# 2016 / 23204-9).

Referencias bibliográficas

Almeida Neto, J.B., Sá, F.B., Buzinhani, M., Timenetsky, J., Mota, R.A., y Almeida, M.Z. (2004). Ocorrência de *Mycoplasma conjunctivae* em ovinos sadios e co ceratoconjuntivite infecciosa no estado de Pernambuco. *Arquivos do Instituto Biológico*, 71, 79-81.

Alves, B.H.L.S., Silva, J.G., Mota, A.R., Campos, A.C., Júnior, J.W.P., Santos, S.B., y Mota, R.A. (2013). Mycoplasma agalactiae in semen and milk of goat from Pernambuco state, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33, 1309-1312.

Amores, J., Corrales, J.C., Martín, Á.G., Sánchez, A., Contreras, A., y de la Fe, C. (2010). Comparison of culture and PCR to detect Mycoplasma agalactiae and Mycoplasma mycoides subsp. capri in ear swabs taken from goats. *Veterinary Microbiology*, 140, 105-108.

Awan, M.A., Abbas, F., Yasinzai, M., Nicholas, R.A.J., Babar, S., Ayling, R.D., ...Ahmed, Z. (2009). Prevalence of Mycoplasma capricolum subspecies capricolum and Mycoplasma putrefaciens in goats in Pishin distric of Balochistan. *Pakistan Veterinary Journal*, 29, 179-185.

Azevedo, E.O., Alcântara, M.D.B., Nascimento, E.R., Tabosa, I.M., Barreto, M.L., Almeida, J.F., ...Castro, R.S. (2006). Contagious agalactia by Mycoplasma agalactiae in small ruminants. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(4), 576-581.

Baas, E.J., Trotter, S.L., Franklin, R.M., y Barile, M.F. (1977). Epidemic caprine keratoconjunctivitis: recovery of Mycoplasma conjunctivae and its possible role in pathogenesis. *Infection and Immunity*, 18, 806-815.

Boom, R., Sol, C.J., Salimans, M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M., y van der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28, 495-503.

Brown, D.R., May, M., Bradbury, J.M., y Johansson, K.E. (2010). Class I. Mollicutes. En N.R. Krieg, W. Ludwig, W. Whitman, B.P. Hedlund, B.J. Paster, J.T. Staley, ...D. Brown (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. 4, pp.568-575). New york: Springer.

Calcutt, M.J., y Foecking, M.F. (2014). Complete Genome Sequence of Mycoplasma bovoculi Strain M165/69T(ATCC 29104). *Genome Announcements*, 2(1), e00115-14.

Calderon-Copete, S.P., Falquet, L., Wigger, G., Wunderlin, C., Schmidheini, T., y Frey, J. (2008). The *Mycoplasma conjunctivae* genome sequencing, annotation and analysis. Manuscrito inédito.

Chávez-González, Y.R., Ros Bascuñana, C., Bölske, G., Mattson, J.G., Fernández-Molina, C., y Johansson, K.E. (1995). In vitro amplification of the 16S rRNA genes from Mycoplasma bovis and Mycoplasma agalactiae by PCR. *Veterinary Microbiology*, 47, 183-190.

DaMassa, A.J. (1983). Prevalence of mycoplasmas and mites in the external auditory meatus of goats. *California Veterinarian*, 37, 10-13.

Egwu, G.O. (1992). In vitro antibiotic sensitivity of Mycoplasma conjunctivae and some bacterial species causing ovine infectious kerato-conjunctivitis. *Small Ruminant Research*, 7(1), 85-92.

Fernández-Aguilar, X., Cabezón, O., Granados, J.E., Frey, J., Serrano, E., Velarde, R., ...López-Olvera, J.R. (2017). Postepizootic persistence of asymptomatic Mycoplasma conjunctivae infection in Iberian ibex. *Applied and Environmental Microbiology*, 83, e00690-17.

Fernández-Aguilar, X., Cabezón, Ó., Marco, I., Mentaberre, G., Frey, J., Lavín, S., y López-Olvera, J.R. (2013). Mycoplasma conjunctivae in domestic small ruminants from high mountain habitats in Northern Spain. *BMC Veterinary Research*, 9, 253.

Franco, M.F., Gaeta, N.C., Alemán, M.A.R., Mellville, P.A., Timenetsky, J., Balara, M.F.A., y Gregory, L. (2019). Bacteria isolated from the lower respiratory tract of

- sheep and their relationship to clinical signs of sheep respiratory disease. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 39(10), 796-801.
- Giacometti, M., Nicolet, J., Johansson, K.E., Naglic, T., Degiorgis, M.-P., Frey, J. (1999). Detection and identification of *Mycoplasma conjunctivae* in infectious keratoconjunctivitis by PCR based on the 16S rRNA gene. *Journal of Veterinary Medicine*, 46,173-180
- Gregory, L., Cardoso, M.V., Birgel Jr., E.H., Teixeira, S.R., Souza, R.M., Pacheco, W.A., ...Benesi, F.J. (2003). Surto de cerato-conjuntivite infecciosa dos caprinos causada por *Mycoplasma conjunctivae* em caprinos adultos, criados no estado de São Paulo. *Arquivos do Instituto Biológico*, 70(2), 179-181
- Hannan, P.C.(2003). Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. International Research Programme on Comparative Mycoplasmaology. *Veterinary Research*, 31(4), 373-395.
- Harasawa, R., y Cassell, G.H. (1996). Phylogenetic analysis of genes coding for 16S rRNA in mammalian ureaplasmas. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(3), 827-829.
- Jansen, B.D., Heffelfinger, J.R., Noon, T.H., Krausman, P.R., y Devos Jr, J.C. (2006). Infectious keratoconjunctivitis in bighorn sheep, Silver Bell Mountains, Arizona, USA. *Journal of Wildlife Diseases*, 42(2), 407-41.
- Johansson, K.-E., y Pettersson, B. (2008). Taxonomy of mycoplasmas. Manuscrito inédito.
- Kumar, P., Roy, A., Bhandari, B.B., y Pal, B.C. (2011). Isolation, identification and molecular characterization of *Mycoplasma* isolates from goats of Gujarat State, India. *Veterinarski Arhiv*, 81, 443-458.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., y Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1547-1549.
- Mercier, P., Pellet, M.-P., Morignat, E., Calavas, D., y Poumarat, F.(2007). Prevalence of mycoplasmas in external ear canal of goats: Influence of the sanitary status of the herd. *Small Ruminant Research*, 73, 296-299.
- Monnerat, M.P., Thiaucourt, F., Poveda, J.B., Nicolet, J., y Frey, J.(1999). Genetic and serological analysis of lipoprotein LppA in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 6, 224-230.
- Motha, M., Frey, J., Hansen, M., Jamaludin, R., y Tham, K. (2003). Detection of *Mycoplasma conjunctivae* in sheep affected with conjunctivitis and infectious keratoconjunctivitis. *New Zealand Veterinary Journal*, 51, 186-190.
- Nakagawa, Y., Muramatsu, Y., Miyashita, M., Sugimoto, M., Yoshino, M., y Kamakura, Y. (2011). NITE Biological Resource Center (NBRC). Manuscrito inédito.
- OIE (2013). Contagious agalactia. En *OIT Terrestrial Manual*. Recuperado de: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.07.03_CONT_AGA-LACT.pdf
- Peixoto, R.M., Andrioli, A., Pinheiro, R.R., Alves, F.S.F., Santos, V.W.S., Sousa, M.M., ... Teixeira, M.F.S. (2018). *Mycoplasma agalactiae* em rebanhos leiteiros no estado do Ceará em associação com o vírus da artrite encefalite caprina. *Acta Scientiae Veterinariae*, 46, 1-7.
- Pereira, L.O., Danelli, M.G.M., Mazur, C., y Galler, R. (2003). Identificação molecular de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* tipo SC isolado do conduto auditivo externo de caprinos clinicamente saudáveis. *Ciência Rural*, 33, 367-368.
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J., y Leonard, F.C. (2005). *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Porto Alegre: Artmed.
- Santos, S.B., Nascimento, E.R., Faccini, J.L.H., Barreto, M.L., y Pereira, V.L. (2009). Potentially pathogenic mycoplasmas in the external ear canal of clinically normal cattle in Southeast Brazil. First report. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 455-457.
- Tully, J.G.(1995). Culture medium formulation for primary isolation and maintenance of mollicutes. En *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology* (pp. 33-40). San Diego: Academic.
- Scott, P.R.(2011). Treatment and Control of Respiratory Disease in Sheep. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 27, 175-186.
- Shah, M.K., Saddique, U., Ahmad, S., Hayat, Y., Rahman, S.U.R., Hassan, M.F., y Ali, T.(2017). Isolation rate and antimicrobial susceptibility profiles of *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* field isolates from sheep and goats in Pakistan. *Small Ruminant Research*, 153, 118-122.
- Pettersson, B., Uhlen, M., y Johansson, K.E. (1996). Phylogeny of some mycoplasmas from ruminants based on the 16S rRNA sequences and definition of a new cluster within the *hominis* group. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(4),1093-1098.
- Pettersson, B., Tully, J.G., Bolske, G., y Johansson, K.E. (2000). Updated phylogenetic description of the *Mycoplasma hominis* cluster based on 16S rDNA sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(Pt 1), 291-301.
- Razin, S., y Hayflick, L. (2010). Highlights of mycoplasma research - An historical perspective. *Biologicals*, 38(2), 183-190.
- Rosengarten, R., Citti, C., Glew, M., Lischewski, A., Drosse, M., Much, P., ...Spergsger, J. (2000). Host-pathogen interactions in mycoplasma pathogenesis: virulence and survival strategies of minimalist prokaryotes. *International Journal of Medical Microbiology*, 290, 15-25.
- Tamura, K., y Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10(3), 512-526.
- Tortora, G.J., Funke, B.R., y Case, C.L. (2012). Procariotos:

- Domínios Bacteria e Archaea. En *Microbiologia* (10ª ed., pp. 319-320). Porto Alegre: Artmed.
- Van Halderen, A., Van Rensburg, W.J., Geyer, A., y Vorster, J.H. (1994). The identification of *Mycoplasma conjunctivae* as an aetiological agent of infectious keratoconjunctivitis of sheep in South Africa. *Journal of Veterinary Research*, 61, 231-237.
- Van Kuppeveld, F.J., van der Logt, J.T., Angulo, A.F., van Zoes, M.J., Quint, W.G., Niesters, H.G., ... Melchers, W.J. (1992). Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 2606-2615.
- Volokhov, D.V., Simonyan, V., Davidson, M.K., y Chizhikov, V.E. (2012). RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene and the 16S-23S rRNA intergenic transcribed spacer region (ITS) as complementary molecular markers in addition to the 16S rRNA gene for phylogenetic analysis and identification of the species of the family Mycoplasmataceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62(1), 515-528.
- Weisburg, W.G., Tully, J.G., Rose, D.L., Petzel, J.P., Oyaizu, H., Yang, D., ... Woese, C.R. (1989). A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *Journal of Bacteriology*, 171(12), 6455-6467.
- Wise, K.S., Calcutt, M.J., Foecking, M., Roske, K., Madupu, R., y Methe, B.A. (2011). Complete Genome Sequence of *Mycoplasma bovis* Type Strain PG45 (ATCC 25523). *Immunology*, 79 (2), 982-983.
- Whitford, H.W., Rosenbusch, R.F., y Lauerman, L.H. (1994). *Mycoplasmosis in Animals, Laboratory Diagnosis*. Ames: Iowa State University.

Nota de contribución

1. Concepción y diseño del estudio, 2. Adquisición de datos, 3. Análisis de datos, 4. Discusión OIE de los resultados, 5. Redacción del manuscrito, 6. Aprobación de la versión final del manuscrito. Natália Gaeta ha contribuido en 1, 2, 3, 4 y 5. Mario Reyes ha contribuido en 2, Jorge Timenetsky ha contribuido en 5 y 6, Lilian Gregory ha contribuido en 4 y 6.

El editor Cecilia Cajarville aprobó este artículo.