

AISLAMIENTO DE *Mycoplasma felis* A PARTIR DE GATOS CON ENFERMEDAD RESPIRATORIA

Copes, J.¹, Nievas, V.¹, Vigo, G.², Castellanos, C.³, Stanchi, N.^{1,2}

ISOLATION OF MYCOPLASMA FELIS FROM CATS WITH RESPIRATORY DISEASE

Mycoplasma felis was isolated from cats with respiratory signs and conjunctivitis. Nasal and conjunctival samples were inoculated in Hayflick modified (HM) broth for 3 days. Tubes showing turbidity were subcultured in solid HM for 48 hours. Colonies morphologically compatibles with *Mycoplasma* genus were observed with film and spot. The genus was identified based on biochemical properties and serology conducted by growth inhibition and epifluorescence using anti *M. felis* CO sera. The protein profile determination was made using the SDS-PAGE technique compared with a standard strain.

Several authors have isolated *Mycoplasma felis* in 20% of healthy cats and in 100% of cats with clinical signs of the disease.

The results of the present study showed that *Mycoplasma felis* would be detected only in those animals showing conjunctivitis and upper respiratory tract disease.

The isolation of *Mycoplasma felis* from cats showing these signs is of clinical importance because the antibiotic therapy used most frequently is not effective against *Mycoplasmas*.

Palabras clave: *Mycoplasma felis*, enfermedad respiratoria.

Key words: *Mycoplasma felis*, respiratory disease.

INTRODUCCIÓN

Si bien la patogenicidad de los micoplasmas en gatos no está bien definida, éstos participan en una variedad de enfermedades felinas tales como afecciones respiratorias, conjuntivitis y artritis. La inoculación experimental de *Mycoplasma felis* y *M. gateae* en gatos produjo conjuntivitis y compromiso de vías respiratorias, las cuales se tradujeron en afecciones crónicas (Campbell y col. 1973; Rosendal, 1979). También estas cepas fueron aisladas de gatos inmunocomprometidos que mostraron signos clínicos de poliartritis. Los microorganismos del Género *Mycoplasma*, poseen particularidades por las cuales se hace imposible su aislamiento empleando métodos bacteriológicos de rutina. Los medios de cultivos deben ser enriquecidos con colesterol y NAD (nicotinamida adenina dinucleótido) y la observación de las colonias se lleva a cabo por medio de lupa estereoscópica. La identificación definitiva de las especies se realiza por medio de pruebas serológicas tales como la inhibición del Crecimiento y Epi-inmunofluorescencia.

El objetivo de este trabajo fue investigar la presencia de microorganismos del Género *Mycoplasma*, a partir de gatos que presentaban conjuntivitis y afección en vías respiratorias superiores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma y procesamiento de las muestras

Las muestras se obtuvieron de 8 gatos mestizos, 6 machos y 2 hembras, de edades entre 18 meses y 3 años. Todos los machos presentaban conjuntivitis y enfermedad respiratoria de las vías superiores, en tanto que las 2 hembras se encontraban clínicamente sanas. Las muestras fueron obtenidas a través de hisopados conjuntivales y nasales por medio de hisopos (Falcon 2069, Vacutainer Systems. USA) embebidos en medio Hayflick modificado (HM) (Freundt, 1983). El material obtenido fue transportado hasta el laboratorio en tubos de hemólisis conteniendo 2 ml de HM a 4°C.

Las muestras fueron sometidas a agitación por medio de un agitador (vórtex), se centrifugaron a 7.500 g durante 10 min. Del sobrenadante obtenido se tomaron 200 µl que fueron inoculados en 2 ml de HM, e incubados a 37°C durante 3 días. Los cultivos en los que se observó turbidez, fueron inoculados en medio HM con el agregado de 1,3% de agar Noble, y se los incubó a 37°C. A partir de las 48 horas de

¹Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Bacteriológicas.

²Cátedra de Microbiología.

³Cátedra de Pequeños Animales. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata, CC 296 (1900) La Plata, Argentina.

incubación, las placas se observaron diariamente con lupa de 40 aumentos. En aquellas placas en las que se visualizaron colonias con características del Género *Mycoplasma* se procedió al clonado en medio sólido, y a la filtración a través de membranas de 0,45 nm (Millipore USA). Las cepas obtenidas fueron inoculadas simultáneamente en medio libre de suero equino.

Caracterización bioquímica de las cepas aisladas

Las siguientes pruebas bioquímicas fueron utilizadas para la caracterización bioquímica de las cepas aisladas: fermentación de la glucosa (FG) (Razin, 1983), hidrólisis de la arginina (HA) (Barile, 1983), producción de fosfatasa (PF) (Bradbury, 1983), reducción del tetrazolio (RT) (Senterfit, 1983 (b)), producción de "film spot" (FS) (Freundt, 1983) y se corroboró la capacidad de desarrollo en presencia de digitonina (PD), (Tully, 1983).

Caracterización serológica de las cepas aisladas

Se llevaron a cabo las pruebas de Inhibición del Crecimiento (IC) (Wallace, 1983) y Epi-inmunofluorescencia (EIFI) de colonias en bloques de agar (Gardella y col., 1983). Se usaron las cepas de referencia CO *Mycoplasma felis* y MART *M. gateae*, ambas cedidas gentilmente por el Instituto de Sanidad Animal, Tsukuba, Japón. Los antisueros fueron realizados en conejo (Senterfit, 1983, a).

Electroforesis proteica

Se llevó a cabo utilizando la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) (Laemmly, 1970). Se usó una concentración de acrilamida del 12,5% y en el gel concentrador del 4%. El buffer de muestra se realizó según la técnica de Mouches y Bové (1983). La corrida se realizó con un voltaje continuo de 100 V, con el miliamperaje discontinuo, en un minigel de 9 x 7 cm durante 60 minutos. Como método de coloración proteica se usó Azul de Coomassie.

RESULTADOS

Se observó turbidez en medio HM solamente en las muestras que provenían de gatos que presentaban signos clínicos de conjuntivitis y afecciones respira-

torias altas. El resultado de la clonación de las mismas evidenció la presencia de colonias características del Género *Mycoplasmas* en HM sólido. La observación se llevó a cabo al cuarto día de incubación a 37°C en atmósfera aeróbica. Las cepas aisladas no se desarrollaron en medios sin suero equino y en presencia de digitonina.

Bioquímicamente las cepas aisladas se comportaron en forma similar a la cepa CO *M. felis* (Cuadro 1).

La caracterización serológica mediante las pruebas de IC y EIFI, evidenció que las cepas aisladas fueron inhibidas por los sueros específicos y produjeron fluorescencia específica cuando se usó suero hiperinmune anti-*M. felis* CO.

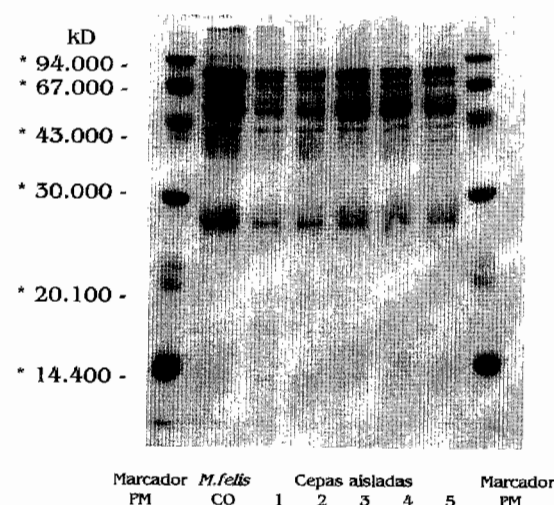
Los perfiles proteicos de las cepas aisladas concordan casi en su totalidad con el perfil proteico de la cepa *M. felis* CO. (Fig. 1).

Las cepas aisladas fueron clasificadas como *Mycoplasma felis*.

DISCUSIÓN

Varios autores han aislado *M. felis* de gatos sanos (20%) y en gatos con signos clínicos de la enfermedad

Figura 1. Patrón electroforético en SDS-PAGE de cepas de *M. felis* aisladas a partir de gatos.



CUADRO 1.
CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE LAS CEPAS DE REFERENCIA *M. FELIS* CO, *M. GATEAE* MART Y DE LAS CEPAS AISLADAS.

cepas	glucosa	arginina	tetrazolio	fosfatasa	film & spot	digitonina
<i>M. felis</i> CO	+	-	-	+	+	-
<i>M. gateae</i> Mart	-	+	-	-	-	-
Cepas aisladas	+	-	-	+	+	-

(100%) (Brown, y col., 1990; Blackmore y Hill, 1973; Rosendal, 1979).

Los resultados obtenidos en este estudio evidenciaron la presencia de *M. felis* solamente en animales que mostraban conjuntivitis y afecciones respiratorias de las vías superiores. En animales clínicamente sanos no se aisló *M. felis*. Sin embargo el número de animales analizados en este trabajo no es suficiente para responsabilizar al microorganismo de la producción de cuadros patológicos. El aislamiento de *M. felis* en gatos con signos clínicos podría indicar un poder patógeno potencial (Campbell y col., 1973). No obstante, esto ha sido pobremente definido y, si bien se ha aislado de procesos patológicos en conjuntiva, fosas nasales, tráquea, pulmón y articulaciones (Campbell y col., 1973; Rosendal, 1979), algunos autores consideran al *M. felis* como parte de los microorganismos normales de los gatos.

La metodología empleada para el aislamiento de micoplasmas puede considerarse confiable y de fácil realización. Según la bibliografía consultada, en Argentina, *M. felis* no ha sido aislado a partir de gatos con anterioridad al presente trabajo. El aislamiento de *M. felis* en gatos con signos clínicos puede considerarse como de importancia para veterinarios clínicos, ya que en estos casos los antibióticos con mecanismos de acción ejercida en la pared bacteriana (penicilinas, ampicilinas, entre otros) no son activos frente a *M. felis*.

RESUMEN

Se aisló *Mycoplasma felis* a partir de gatos con signos de conjuntivitis y de enfermedad respiratoria. Los hisopados nasales y conjuntivales fueron sembrados en medio Hayflick modificado (HM) durante 3 días observándose en algunos de los tubos turbidez, los cuales fueron repicados en H.M. sólido durante 48 horas. Se observaron colonias morfológicamente compatibles con el Género *Mycoplasma*, con formación de film & spot. La caracterización de Género se realizó mediante pruebas bioquímicas, la identificación serológica mediante las siguientes pruebas: Inhibición del Crecimiento (IC) y Epiimmunofluorescencia (EIFI) utilizando suero anti-*M. felis* CO y la determinación del perfil proteico mediante la técnica SDS-PAGE confrontándolo con el de la cepa patrón. Varios autores han aislado *Mycoplasma felis* en 20% de gatos sanos y en 100% de gatos con signos clínicos de la enfermedad. Los resultados de este estudio evidenciaron la presencia de *Mycoplasma felis* solamente en los animales que mostraron signos de conjunti-

vit y enfermedades de las vías respiratorias altas. El aislamiento de *Mycoplasma felis* en gatos con estos signos es de importancia en la clínica, debido a que los antibióticos frecuentemente usados no son efectivos frente a micoplasmas.

BIBLIOGRAFÍA

- BARILE, M. 1983. Arginine Hydrolysis. Method in mycoplasmaology. Vol. 1. Mycoplasma characterization. Ed. Razin, S.; Tully, J. Academic Press, New York. E 3: 345-350.
- BLACHMORE, D.K. and HILL, A. 1973. The Experimental Transmission of Various Mycoplasmas of Feline Origin to Domestic Cats. (*Felis catus*). J. Small Anim. Pract. 14: 7-13.
- BRADBURY, J. 1983. Phosphatase Activity. Method in mycoplasmaology. Vol. 1. Mycoplasma characterization. Ed. Razin, S.; Tully, J. Academic Press, New York. E6: 363-366.
- BROWN, M.; GIONET, P.; and SENIOR, D. 1990. Identification of *Mycoplasma felis* and *Mycoplasma gateae* by an Immunobinding Assay. J. Clin. Microbiol. 28: 1870-1873.
- CAMPBELL, L.; SNYDER, S.; REED, C. *et al.*: *Mycoplasma felis* associated conjunctivitis in cats. J. Am. Vet. Med. Assoc. 163: 991-995, 1973.
- FREUNDT, E.A. 1983. Culture Media for Classic Mycoplasma. Method in mycoplasmaology. Vol. 1. Mycoplasma characterization. Ed. Razin, S.; Tully, J. Academic Press, New York. C7: 127-135.
- FREUNDT, E.A. 1983. Film and Spot Production. Method in mycoplasmaology. Vol. 1. Mycoplasma characterization. Ed. Razin, S.; Tully, J. Academic Press, New York. E8: 373-374.
- GARDELLA, R.; DEL GIUDICE, F.; TULLY, J. 1983. Immunofluorescence. Method in mycoplasmaology. Vol. 1 Mycoplasma characterization, Ed. Razin, S.; Tully, J. Academic Press, New York. E7: 431-440.
- LAEMMLY, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage. T4. Nature (London). 227: 680-685.
- MOUCHES, C. and BOVÉ, JH. 1983. Electrophoretic Characterization of Mycoplasma Proteins. Method in mycoplasmaology. Vol. 1. Mycoplasma characterization. Ed. Razin, S.; Tully, J. Academic Press, New York. D5: 241-255.
- RAZIN, S. and V.P. CIRILLO. 1983. Sugar Fermentation. Method in mycoplasmaology. Vol. 1. Mycoplasma characterization. Ed. Razin, S.; Tully, J. Academic Press, New York. E2: 337-343.
- ROSENDAL, S. 1979. Canine and feline mycoplasmas. Vol. 2. p. 217-234. In J.G. Tully and R.F. Whitcomb (de.) The Mycoplasmas, vol. 2. Academic Press. Inc., New York.
- SENERFIT, L. 1983. (a). Preparation of Antigens and Antisera. Method in mycoplasmaology. Vol. 1. Mycoplasma characterization. Ed. Razin, S.; Tully, J. Academic Press, New York. F2: 401-404.
- SENERFIT, L. 1983. (b). Tetrazolium Reduction. Method in mycoplasmaology. Vol. 1. Mycoplasma characterization. Ed. Razin, S.; Tully, J. Academic Press, New York. E10: 377-378.
- TULLY, J. 1983. Test form Digitonin Sensitivity and Sterol Requirement. Method in mycoplasmaology. Vol. 1. Mycoplasma characterization. Ed. Razin, S.; Tully, J. Academic Press, New York. E5: 355-362.
- WALLACE, A., CLYDE, JR. 1983. Growth Inhibition Test. Method in mycoplasmaology. Vol. 1. Mycoplasma characterization. Ed. Razin, S.; Tully, J. Academic Press, New York. F3: 405-410.