

Detección de diferentes subtipos genéticos de *Mycoplasma bovis* en Argentina

Detection of different *Mycoplasma bovis* genetic subtypes in Argentina

ESTANGUET, A.A.¹, TAMIOZZO, P.J.^{1, 2}, TIRANTE, L.³, CHAVES, J.³, RAVIOLO, J.⁴, GIRAUDO, J.¹, AMBROGI, A.¹

¹Depto Patología Animal. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto. Ruta 36, km 601. Río Cuarto, Córdoba, República Argentina. ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), República Argentina. ³Laboratorio Lactodiagnóstico Sur S.R.L. Pedro Goyena 3187. Olivos, Buenos Aires, República Argentina. ⁴Depto Producción Animal. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto. Ruta 36, km 601. Río Cuarto, Córdoba, República Argentina.

RESUMEN

Mycoplasma bovis es el mycoplasma causante de mastitis más importante en vacas lecheras y ha sido diagnosticado en nuestro país así como a nivel mundial. Para realizar estudios epidemiológicos de brotes, el análisis por MLVA parece ser una herramienta adecuada para la tipificación genética del patógeno. En el presente trabajo se analizaron 7 cepas de *M. bovis* provenientes de 2 tambos distintos (muestras de leche de tanque de enfriado, y cuartos mamarios de vacas con y sin signos de mastitis) que habían sido previamente identificadas. Se estudiaron por PCR 4 regiones que comprenden secuencias repetidas en tándem (TR). Dentro de los loci TR analizados, sólo se encontró variabilidad en TR 52, en el cual se observaron 2 posibles alelos en muestras que provenían de vacas con mastitis clínica. Según el conocimiento de los autores es la primera vez que se informa la utilización del análisis MLVA para detectar subtipos genéticos entre cepas de *M. bovis* en Argentina.

Palabras clave: (ganado lechero), (mastitis), (*Mycoplasma bovis*), (subtipos genéticos), (MLVA).

Correspondencia e-mail: Pablo Tamiozzo topo.vet@gmail.com

Recibido: 01-09-2014
Aceptado: 05-08-2015

SUMMARY

Mycoplasma bovis is the most important cause of mycoplasmal mastitis in dairy cows and has been diagnosed in our country and worldwide. MLVA analysis seems to be a suitable tool to type this pathogen, for epidemiological studies of outbreaks. In the present work, 7 strains of *M. bovis* were analyzed. They had been obtained from 2 different herds (milk samples from bulk tank milk and mammary quarters of cows with and without mastitis's clinical signs) and had been previously identified. Four tandem repeat regions (TR) were studied. Among the TR loci studied, variability was found in only one of them (TR52), in which 2 possible alleles were observed in samples from cows with clinical mastitis. According to the author's knowledge this is the first report of the use of MLVA for the genetic subtyping of *M. bovis* strains in Argentina.

Key words: (dairy cattle), (mastitis), (*Mycoplasma bovis*), (genetic subtypes), (MLVA).

INTRODUCCIÓN

Mycoplasma bovis puede causar mastitis, infertilidad y abortos en vacas adultas y neumonía, otitis y artritis en terneros^{12,17}. Es el mycoplasma causante de brotes de mastitis más importante en vacas lecheras y por ello es responsable de importantes pérdidas económicas en todo el mundo⁸. Debido a que los signos clínicos y los hallazgos patológicos de una infección por *M. bovis* no son característicos, la confirmación del agente con técnicas diagnósticas certeras es necesaria. Hoy en día, para la detección de *M. bovis* se utilizan como técnicas de diagnóstico de laboratorio el cultivo y aislamiento, la serología y varios formatos de PCR a partir de aislamientos sospechosos o directamente de muestras clínicas^{7, 9, 10, 16, 21}.

Por un lado, para comprender algunos aspectos de la epidemiología de *M. bovis*, para el estudio de brotes de mastitis y/o neumonía, transmisión y rol de animales portadores asintomáticos, varias técnicas de tipificación como el AFLP-PCR (Amplified-Fragment Length Polymorphism PCR), PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis), AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR), RAPD-PCR (Random Amplification of Polymorphic DNA), MLST (Multiple Locus Sequence Typing) y el MLVA (Multiple Locus Variable-Number of

Tandem-Repeats Analysis) han sido informadas^{4, 5, 11, 13, 14, 18}. Sin embargo, debido a la pobre reproducibilidad, al bajo poder discriminatorio, al alto costo de equipos y a lo laborioso de algunas de estas técnicas, el análisis MLVA parece ser el indicado para la tipificación de *M. bovis*¹⁸.

Por otro lado, la presencia de *M. bovis* ha sido informada en nuestro país⁶, así como en otros países sudamericanos como Chile²² y Brasil¹⁵. En Argentina existen los recursos tecnológicos y del conocimiento que son necesarios para el diagnóstico y la identificación de *M. bovis*, sin embargo poco se sabe sobre la existencia de diversos genotipos del agente, lo que contribuiría grandemente a un mejor conocimiento del comportamiento epidemiológico del patógeno en nuestro medio. Por ello, el objetivo del presente trabajo es la identificación de subtipos genéticos de *M. bovis* mediante la técnica de MLVA a partir de muestras de leche.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Patología Animal de la Facultad de Agronomía y Veterinaria (Universidad Nacional de Río Cuarto) de acuerdo a las pautas internacionales del CIOMS (Council for International Organizations of Medical Sciences).

Cepas de *M. bovis*: Para el estudio se utilizó el ADN (conservado a -70°C) de siete cepas de *M. bovis* que habían sido previamente identificadas²⁶. Dos de esas cepas (I y II) habían sido aisladas de leche proveniente del tanque de enfriado (tambo A) y las cinco restantes (III a VII) habían sido aisladas de cuartos mamarios de vacas con y sin mastitis clínica (tambo B). Para más detalle del origen de cada una de las muestras ver Tabla 1. Brevemente, las muestras de leche habían sido cultivadas en medio de Hayflick, al menos 7 días a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ con 10% CO_2 , posteriormente observadas con lupa estereoscópica y las colonias seleccionadas fueron repicadas en medio líquido. Los mycoplasmas (un mL del cultivo líquido) habían sido recogidos por centrifugación ($8,000 \times g$ por 10 min), lavados (dos veces con solución salina tamponada estéril) y resuspendidos en 150 μL de agua ultrapura estéril. El ADN había sido extraído por hervido (10 min) y las siete cepas habían sido identificadas como *M. bovis* mediante la amplificación por PCR de un fragmento del gen *uvrC* con condiciones y cebadores descritos previamente^{24,28}.

Análisis MLVA: Para el análisis por MLVA de las cepas se incluyeron cuatro zonas con repeticiones en tándem (TR) – seleccionadas a partir de un repertorio de 9 zonas por ser las más

polimórficas descritas en un estudio previo¹⁸. Los *loci* analizados fueron: TR 35, TR 40-41, TR 49-51 y TR 52. La amplificación de cada TR se realizó utilizando los mismos cebadores y condiciones descritas por los autores¹⁸. Todos los productos de las PCRs fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1,2% teñido con Bromuro de Etidio (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a 45 V por 5 horas.

RESULTADOS

Los alelos que fueron determinados para las regiones analizadas (TR 35, TR 40-41, TR 49-51 y TR 52) se muestran en la tabla 1. El tamaño aproximado de los amplicones fue de 150 a 900 bp (tabla 1 y figura 1). De los 4 *loci* TR analizados, sólo se encontró variabilidad en TR 52, que llamativamente mostró dos probables alelos en una misma muestra, en el caso de dos muestras que provenían de vacas con mastitis clínica del tambo B (tabla 1).

DISCUSIÓN

El 28,5% de las muestras (2/7) mostraron un subtipo genético diferente al resto, sólo en una región repetida en tándem (TR 52) presentando dos posibles alelos en esta región. Esto podría deberse a la presencia de diferentes genotipos de *M. bovis*, a reacciones inespecíficas

Tabla 1. Alelos determinados por electroforesis de los amplicones correspondientes a los *loci* TR analizados en las 7 cepas de *M. bovis* que fueron tipificadas. Tamaño de los probables alelos (aproximados): 1) 150pb, 2) 900pb, 3) 490pb, 4) 550pb and 5) 650pb.

Tambo		A		B				
Cepa de <i>M. bovis</i>		I	II	III	IV	V	VI	VII
Origen de la muestra de leche ^a		TE	TE	MC	MC	MSc	MSc	MSc
Regiones	TR 35	1	1	1	1	1	1	1
	TR 40-41	2	2	2	2	2	2	2
	TR 49-51	3	3	3	3	3	3	3
	TR 52	4	4	4 y 5	4 y 5	4	4	4

^aTE: tanque de enfriado; MC: vaca con mastitis clínica; MSc: vaca con mastitis sub-clínica.

de los cebadores o a la existencia de regiones homólogas en distintas partes del genoma. En estudios previos de caracterización de aislamientos de *M. bovis*²³ también se ha informado la aparición de múltiples bandas, pero en el caso de la amplificación de otros loci TR. Por otra parte, la presencia de dos cepas infectando simultáneamente algunos ovinos ha sido demostrada en el caso de *Mycoplasma conjunctivae*³ y este fenómeno ha sido hallado también en nuestro trabajo con *Mycoplasma hyopneumoniae*²⁷ donde lo observamos en una región del gen *p146* de *M. hyopneumoniae* (gen homólogo del *lppS* de *M. conjunctivae*).

La idea de una posible infección con dos cepas de *M. bovis* simultáneamente en el mismo animal se tornaría importante si se considera que, curiosamente, en el presente estudio las muestras que presentaron dos posibles alelos provenían de muestras de leche de vacas con mastitis clínica,

mientras las demás muestras eran de leche de tanque de enfriado o de vacas sin signos clínicos de mastitis. En este sentido, algunos estudios de brote de mastitis o neumonía debidos a *M. bovis* han mostrado que una misma cepa sería la responsable del brote y aparentemente existirían cepas específicas de cada tambo involucradas, aunque dichos estudios utilizaron otras técnicas moleculares como PFGE y *Southern blot*^{1, 19, 20}. Debido a que la TR 52 codificaría para una lipoproteína, esto podría tener implicancias en la virulencia y por ende en la severidad de los signos clínicos sin embargo debería estudiarse en profundidad ésta y otras regiones codificantes y/o las lipoproteínas que éstas codifican.

Los otros loci TR no mostraron diferencias, contrariamente a lo previamente señalado por Pinho *et al.*¹⁸ quienes encontraron para TR 35, TR 40-41 y TR 49-51 hasta 3, 5 y 3 alelos respectivamente, y en base a ese polimorfismo

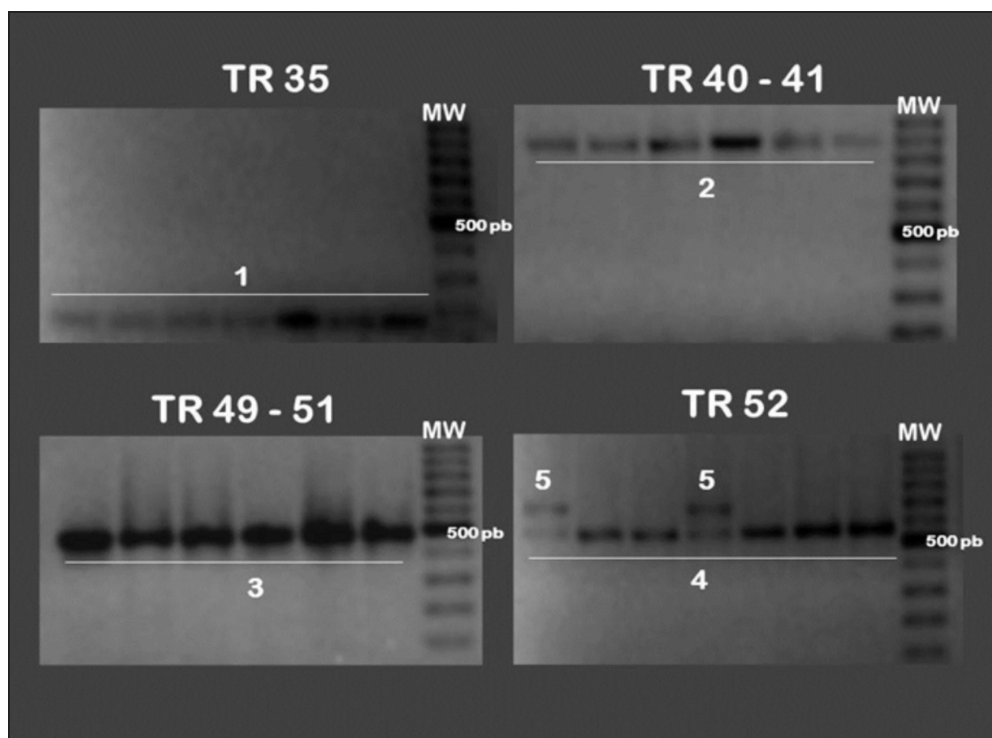


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR correspondientes a las TR 35, TR 40-41, TR 49-51 y TR 52. Los diferentes números indican diferentes alelos. A la derecha se observa el marcador de peso molecular -MW- (100 pb DNA Ladder, INBIO) y se indica el tamaño de una de sus bandas.

es que fueron escogidas para el presente estudio. La escasa variabilidad encontrada podría deberse al menor número de muestras analizadas o a que realmente no existe diversidad en esas regiones dentro de las cepas circulantes en los tambos estudiados.

Hasta el momento sólo pueden compararse los alelos de los *loci* estudiados en el presente trabajo con los de la cepa PG45 de *M. bovis* o con los publicados por Sulyok *et al.*²⁵, ya que en las otras publicaciones disponibles^{2, 18} no se informa el número de Unidades de Repetición de los alelos encontrados.

Además, y siempre considerando solamente las cuatro TR analizadas en el presente estudio, los perfiles alélicos obtenidos podrían ser los mismos a los obtenidos por Pinho *et al.*¹⁸ y Sulyok *et al.*²⁵, quienes analizaron cepas de Portugal, Francia, Alemania, Irlanda, Italia, España, Inglaterra, Hungría y Estados Unidos de Norteamérica. Sin embargo, como señalan Sulyok *et al.*²⁵, debido a que los perfiles alélicos de cada una de las muestras (individualmente) no son publicados, como en el presente estudio, y que tampoco existe una base de datos con los patrones de las TR de *M. bovis* esto no puede aseverarse fehacientemente.

El análisis MLVA ha mostrado tener un alto poder discriminatorio respecto a otras técnicas de tipificación²⁵. Incluso el esquema original propuesto por Pinho *et al.*¹⁸ fue mejorado por Spargser *et al.*²³. Esto sumado a la ductilidad de la técnica la convierten en una buena opción para estudios epidemiológicos.

Si bien el presente estudio no se focalizó en estudios de brotes, el análisis MLVA ha demostrado su utilidad en este tipo de estudios^{2, 23}. Ensayos con un mayor número de muestras en nuestro país y la región serían necesarios para poder identificar un mayor número de subtipos genéticos de *M. bovis*. Dado que las TR analizadas en el presente estudio codificarían para lipoproteínas los cambios en el número de repeticiones podrían generar variantes de las mismas, que tendrían impacto sobre la virulencia y/o la inmunogenicidad. Según el conocimiento de los autores es la primera vez que se informa

la utilización del análisis MLVA para establecer diferencias entre cepas de *M. bovis* en Argentina.

CONCLUSIONES

Para los *loci* TR analizados, se encontró una escasa variabilidad entre las cepas estudiadas, con el hallazgo de 2 posibles alelos en un mismo locus para 2 de las cepas analizadas.

BIBLIOGRAFIA

1. Aebi, M.; Bodmer, M.; Frey, J.; Pilo, P. 2012. Herd-specific strains of *Mycoplasma bovis* in outbreaks of mycoplasmal mastitis and pneumonia. *Vet Microbiol.* 157 (3-4): 363-368.
2. Amram, E.; Freed, M.; Khateb, N.; Mikula, I.; Blum, S.; Spargser, J.; Sharir, B.; Ozeri, R.; Harrus, S.; Lysnyansky, I. 2013. Multiple locus variable number tandem repeat analysis of *Mycoplasma bovis* isolated from local and imported cattle. *Vet J.* 197(2):286-90.
3. Belloy, L.; Janovsky, M.; Vilei, E.M.; Pilo, P.; Giacometti, M.; Frey, J. 2003. Molecular Epidemiology of *Mycoplasma conjunctivae* in *Caprinae*: Transmission across Species in Natural Outbreaks. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: (4): 1913-1919.
4. Biddle, M.K.; Fox, L.K.; Evans, M.A.; Gay, C.C. 2005. Pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Mycoplasma* isolates from various body sites in dairy cattle with *Mycoplasma mastitis*. *J Am Vet Med Assoc.* 227(3):455-9.
5. Butler, J.A.; Pinnow, C.C.; Thomson, J.U.; Levisohn, S.; Rosenbusch, R.F. 2001. Use of arbitrarily primed polymerase chain reaction to investigate *Mycoplasma bovis* outbreaks. *Vet Microbiol.* 78(2):175-81. Erratum in: *Vet Microbiol* 2001; 80(4):393-394.
6. Cerdá, R.; Xavier, J.; Sansalone, P.; de la Sota, R.; Rosenbush, R. 2000. Isolation of *Mycoplasma bovis* during an outbreak of bovine mastitis at a dairy farm in the province of Buenos Aires. 1st report in the Republic of Argentina. *Rev Latinoam Microbiol.* 42(1): 7-11.
7. Foddai, A.; Idini, G.; Fusco, M.; Rosa, N.; de la Fe, C.; Zinellu, S.; Corona, L.; Tola, S. 2005. Rapid differential diagnosis of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis*

- based on a multiplex-PCR and a PCR-RFLP. *Mol Cell Probes*. 19(3): 207-212.
8. González, R.N.; Wilson, D.J. 2003. Mycoplasmal mastitis in dairy herds. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 19(1):199-221.
 9. Hayman, B.; Hirst, R. 2003. Development of a semi-nested PCR for the improved detection of *Mycoplasma bovis* from bovine milk and mucosal samples. *Vet Microbiol*. 91(2-3): 91-100.
 10. Hirose, K.; Kawasaki, Y.; Kotani, K.; Tanaka, A.; Abiko, K.; Ogawa, H. 2001. Detection of mycoplasma in mastitic milk by PCR analysis and culture method. *J Vet Med Sci*. 63(6): 691-693.
 11. Kokotovic, B.; Friis, N.F.; Jensen, J.S.; Ahrens, P. 1999. Amplified-fragment length polymorphism fingerprinting of *Mycoplasma* species. *J Clin Microbiol*. 37(10): 3300-3307
 12. Lamm, C.G.; Munson, L.; Thurmond, M.C.; Barr, B.C.; George, L.W. 2004. *Mycoplasma* otitis in California calves. *J Vet Diagn Invest*. 16 (5): 397-402.
 13. Manso-Silvan, L.; Dupuy, V.; Lysnyansky, I.; Ozdemir, U.; Thiaucourt, F. 2012. Phylogeny and molecular typing of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* by multilocus sequencing. *Vet Microbiol*. 161(1-2):104-12.
 14. McAuliffe, L.; Kokotovic, B.; Ayling, R.D.; Nicholas, R.A. 2004. Molecular epidemiological analysis of *Mycoplasma bovis* isolates from the United Kingdom shows two genetically distinct clusters. *J Clin Microbiol*. 42 (10): 4556-4565.
 15. Mettifogo, E.; Nascimento, E. R.; Muller, E. E.; Nascimento, M. G. F.; Freitas, J. C. 1996. Mastite bovina por *Mycoplasma bovis*. *Rev Bras Med Vet*. 18 (1): 22-25.
 16. Nicholas, R.; Ayling, R.; McAuliffe, L. 2008. *Mycoplasma* diseases of ruminants. CAB international editor. Oxfordshire UK.
 17. Nicholas, R.A.; Ayling, RD. 2003. *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. *Res Vet Sci*. 74 (2): 105-112.
 18. Pinho, L.; Thompson, G.; Rosenbusch, R.; Carvalheira, J. 2012. Genotyping of *Mycoplasma bovis* isolates using multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis. *J Microbiol Methods*. 88 (3): 377-385.
 19. Punyapornwithaya, V.; Fox, L.K.; Hancock, D.D.; Gay, J.M.; Wenz, J.R.; Alldredge, J.R. 2011. Incidence and transmission of *Mycoplasma bovis* mastitis in Holstein dairy cows in a hospital pen: A case study. *Prev Vet Med*. 98 (1):74-78.
 20. Punyapornwithaya, V.; Fox, L.K.; Hancock, D.D.; Gay, J.M.; Alldredge, J.R. 2010. Association between an outbreak strain causing *Mycoplasma bovis* mastitis and its asymptomatic carriage in the herd: a case study from Idaho, USA. *Prev Vet Med*. 93 (1):66-70.
 21. Rossetti, B.C.; Frey, J.; Pilo, P. 2010. Direct detection of *Mycoplasma bovis* in milk and tissue samples by real-time PCR. *Mol Cell Probes*. 24 (5): 321-323.
 22. Sickles, S.A.; Kruze, J.; Gonzalez, R. N. 2000. Aislamiento de *Mycoplasma bovis* en muestras de leche de estanque en rebanos lecheros del sur de Chile. *Arch Med Vet*. 32 (2): 235-240.
 23. Spergser, J.; Macher, K.; Kargl, M.; Lysnyansky, I.; Rosengarten, R. 2013. Emergence, re-emergence, spread and host species crossing of *Mycoplasma bovis* in the Austrian Alps caused by a single endemic strain. *Vet Microbiol*. 164 (3-4): 299-306.
 24. Subramaniam, S.; Bergonier, D.; Poumarat, F.; Capaul, S.; Schlatter, Y.; Nicolet, J.; Frey, J. 1998. Species identification of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* based on the *uvrC* genes by PCR. *Mol Cell Probes*. 12 (3): 161-169.
 25. Sulyok, K.M.; Kreizinger, Z.; Fekete, L.; Janosı, S.; Schweitzer, N.; Turcsanyi, I.; Makrai, L.; Erdelyi, K.; Gyuranecz, M. 2014. Phylogeny of *Mycoplasma bovis* isolates from Hungary based on multi locus sequence typing and multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *BMC Vet Res*. 10 (1):108.
 26. Tamiozzo, P.; Estanguet, A.; Maito, J.; Tirante, L.; Pol, M.; Giraudo, J.A. 2014. Detection of *Mycoplasma canadense* and *Mycoplasma californicum* in dairy cattle from Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 46 (2): 119-121.

27. Tamiozzo, P.J; Lucchesi, P.M.A y Ambrogi, A. Diversidad genética de *Mycoplasma hyopneumoniae* en granjas porcinas de Argentina. *InVet* [online]. 2011, 13 (1): 27-35.
28. Thomas, A.; Dizier, I.; Linden, A.; Mainil, J.; Frey, J.; Vilei, E.M. 2004. Conservation of the *uvrC* gene sequence in *Mycoplasma bovis* and its use in routine PCR diagnosis. *Vet J.* 168 (1):100-102.

