

Rev Biomed 1999; 10:159-165.

Poliartritis en cerdos de engorde: aislamiento y caracterización de Mycoplasma hyosynoviae y Acholeplasma granularum.

Artículo Original

Julio Copes¹, Sebastián Acosta Lualdi¹, Karina Pellicer¹, Nestor Oscar Stanchi², Juan Carlos Perfumo³.

¹Cátedra Tecnología y Sanidad de los Alimentos. ²Cátedra de Microbiología y Laboratorio de Investigaciones y Diagnostico Bacteriológicos. ³ Instituto de Patología Dr. B. Epstein. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

RESUMEN.

Objetivo. Investigar la presencia de microorganismos pertenecientes a los géneros *Mycoplasma* y *Acholeplasma* de muestras de exudado articular obtenido de cerdos con lesiones de poliartritis.

Material y Métodos. Las muestras se sembraron en medio de Hayflick modificado y se incubaron en aerobiosis, en microaerobiosis y en anaerobiosis. Se realizó la caracterización bioquímica de las cepas aisladas mediante las pruebas de: fermentación de la glucosa, hidrólisis de la arginina, reducción del tetrazolium, producción de la enzima fosfatasa y observación de "film and spot". Se realizó la identificación serológica mediante las pruebas de inhibición de crecimiento y epi-inmunofluorescencia con sueros de referencia. Mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, se compararon los perfiles proteicos de las cepas aisladas con las cepas de referencia S16 de *Mycoplasma hyosynoviae* y BTS39 de *Acholeplas-*

ma granularum.

Resultado. Sobre la base de los resultados obtenidos, dos de las cepas obtenidas correspondieron a *M. hyosynoviae* y una a *A. granularum*.

Discusión. La implementación de esta metodología permitió el aislamiento de *M. hyosynoviae* y *A. granularum* a partir de cerdos con lesiones articulares, por primera vez en Argentina. Consideramos lo expuesto de gran valor, ya que en el futuro veterinarios y productores deberán tener en cuenta esta entidad patológica en la producción de cerdos. (*Rev Biomed 1999; 10:159-165*)

Palabras clave: *Mycoplasma hyosynoviae*, *Acholeplasma granularum*, porcicultura, microbiología veterinaria, poliartritis.

SUMMARY.

Poliarthrititis in growing pigs: isolation and

Solicitud de sobretiros: Prof. Dr. Nestor Oscar Stanchi, CC 296 (1900) La Plata, Argentina.

E-mail: stanchi@fcv.medvet.unlp.edu.ar

TEL/FAX: +54-221-4257980

Recibido el 6/Octubre/1998. Aceptado para publicación el 18/Enero/1999.

Este artículo esta disponible en <http://www.uady.mx/~biomedic/rb991034.pdf>

Vol. 10/No. 3/Julio-Septiembre, 1999

J Copes, S Acosta Lualdi, K Pellicer, NO Stanchi, JC Perfumo.

characterisation of *Mycoplasma hyosynoviae* and *Acholeplasma granularum*.

Objective. To detect the microorganisms belonging to the genus *Mycoplasma* from joint exudate from growing pigs with polyarthritis lesions.

Materials and Methods. The samples were streaked on modified Hayflick medium and were placed in aerobic, microaerobic, and anaerobic atmosphere. In those cultures in which it was possible to observe growth, they were clonated and streaked on serum free medium. The following biochemical test was performed on the isolate strains: glucose fermentation, arginine hydrolysis, tetrazolium reduction, fosfatase production and film and spot observation. The serotyping of the isolated strains was performed by means of growth inhibition test and indirect epi-immunofluorescence test with reference serum. The protein profiles were compared by means of sodium dodecil sulfate polyacrylamide gel electrophoresis between isolated strains and reference strains *Mycoplasma hyosynoviae* S16 and *Acholeplasma granularum* BTS39.

Results. On the basis of the obtained results, two isolated strains correspond to *Mycoplasma hyosynoviae* and the another strain to *Acholeplasma granularum*.

Discussion. With this methodology we isolate of *M. hyosynoviae* and *A. granularum* from pigs with arthritis for the first time in Argentina. We conclude that it is of great value for Veterinarians and farmers and that they should take this pathological entity into account in pig production.

(*Rev Biomed* 1999; 10:159-165)

Key words: *Mycoplasma hyosynoviae*, *Acholeplasma granularum*, pig production, veterinarian microbiology, polyarthritis.

INTRODUCCIÓN.

La poliartritis y sinovitis crónicas en cerdos de engorde es un cuadro patológico que puede ser producido por diversos agentes etiológicos,

incluyendo microorganismos del género *Mycoplasma* (1). La poliartritis producida por *Mycoplasma hyosynoviae* se caracteriza clínicamente en su faz aguda por cojera súbita, rigidez y deformación articular en cerdos de más de 12 semanas, no acompañada de fiebre (2-4). La evolución ulterior puede resolverse espontáneamente sin secuelas, o bien, progresar hasta producir lesiones severas en el cartílago articular, cuadro éste que puede confundirse con las manifestaciones clínicas de la entidad denominada osteocondrosis. En la etapa aguda, es frecuente el aislamiento de *M. hyosynoviae* de exudado articular (2). Se considera al *M. hyosynoviae* como un habitante normal de las vías respiratorias, nariz, faringe, traquea y bronquios, facilitando dicha colonización, la difusión aerógena del agente. La artritis y sinovitis producida por el *M. hyosynoviae* ha sido descripta en Estados Unidos de Norte América, Australia, Inglaterra y Japón (5).

El microorganismo *Acholeplasma granularum*, se diferencia del género *Mycoplasma* por no requerir colesterol (suero equino y porcino) para su desarrollo (6). El *A. granularum* es considerado como un microorganismo no patógeno (3) pudiendo ser aislado al igual que el *M. hyosynoviae* a partir de las vías nasofaríngeas, o en lesiones articulares en conjunción con este último (7).

El objetivo de la presente comunicación fue la descripción de los métodos y técnicas utilizados para el aislamiento y caracterización de *Mycoplasma hyosynoviae* y *Acholeplasma granularum* a partir de lesiones articulares de cerdos en engorde.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Toma de muestras y condiciones de cultivo

Se tomaron muestras de líquido articular con jeringa hipodérmica y aguja 21/6, de la articulación del tarso de tres cerdos de aproximadamente tres meses de edad, que presentaban cojera y rigidez articular. El volumen obtenido fue de aproximadamente 0,5 mL cada una.

Poliartritis en cerdos.

Diez muestras fueron recibidas en nuestro laboratorio obtenidas por medio de hisopado (Hisopos Swabrit-t Lab. Britania, Argentina) del líquido articular cuando se realizaba la necropsia de los animales. Ambas fueron sembradas directamente en 2 mL de medio Hyflick modificado (HM) (2) con el agregado de 5% de mucina bacteriológica (Difco Lab. USA).

En ambos tipos de muestras a partir de los inóculos primarios, se realizaron diluciones seriadas (1/10). En forma paralela, estas diluciones se sembraron en medio HM líquido y sólido, esto se llevó a cabo con el agregado del 1,3% de agar Noble (Difco Lab. USA). Todos los medios se incubaron a 37°C durante cuatro días en aerobiosis, microaerobiosis y anaerobiosis (Gass Pack Anaerobic System, BBL).

En las diluciones que se observó un leve enturbiamiento, se procedió a la siembra en medio HM sólido incubándose en similares condiciones.

Con lupa microscópica 4x (Nikon UFX-DX Japón) se procedió a la búsqueda de colonias características de los géneros *Mycoplasma* y *Acholeplasma*. Una vez ubicada se realizó la clonación en medio HM y la siembra en medios libres de suero porcino (8), Incubándose en las condiciones ya mencionadas.

Se utilizaron en forma paralela las cepas de referencia de *M. hyosynoviae* S16, *M. hyorhinis* BTS7, *M. hyorhinis* EG29 y *A. granularum* BTS39, gentilmente cedidas por el Instituto Nacional de Sanidad Animal, Tsukuba, Japón.

Caracterización bioquímica

Se determinó la capacidad de fermentar la glucosa, utilizando el medio de cultivo HM líquido con el agregado de glucosa al 1,25% y rojo de fenol al 0,1%. La hidrólisis del aminoácido arginina se realizó según la técnica de Barile (9), la capacidad de reducción del tetrazolium según Senterfit (10), la producción de fosfatasa según Bradbury (11), la producción de "film and spot" se observó en medio HM y en medio yema de huevo descrito por Freundt (12) y se corroboró si las cepas aisla-

das desarrollaban en presencia de digitonina (13).

Tipificación serológica

Se realizaron las pruebas Inhibición de Crecimiento (IC) (14) y Epi-inmunofluorescencia indirecta (EIFI) de colonias en bloques de agar (15,16). Estas pruebas se llevaron a cabo con sueros hiperinmunes anti *M. hyosynoviae* S16 y *A. granularum* DTS39 obtenidos en conejos y cedidos por el Centro de Referencia para Mycoplasmas animales, Universidad de Arrhus, Dinamarca.

Determinación del perfil proteico

Se llevo a cabo por medio de la electroforesis en gel de poliacrilamida, de acuerdo con la técnica descrita por Laemmly, U.K. (17-19), utilizándose una concentración de acrilamida al 12,5% en el gel disociador y un gel de partida al 4%. La muestra se suspendió en buffer tris pH 6,8, -mercaptoetanol y dodecil sulfato de sodio (SDS). La corrida se reveló con Azul Brillante de Coomasie R 250 (Sigma CH. CO. USA.) y se utilizaron en forma paralela las cepas de referencia *M. hyosynoviae* S16, *M. hyorhinis* BTS7 y PG29 y *A. granularum* BTS39. Para la determinación del peso molecular se utilizó un marcador de bajo peso molecular (LMM, Pharmacia Kit USA).

RESULTADOS.

Se comprobó el desarrollo de tres cepas en medio HM, dos de las cuales se visualizaron a las 72 h de incubación (cepas A y B) a 37EC tanto en condiciones de aerobiosis como en 15% de CO₂ y en anaerobiosis (figuras 1 y 2). Se observó un mayor desarrollo en aerobiosis. La cepa restante (cepa C), desarrolló en medio HM con y sin el agregado de suero porcino.

Caracterización bioquímica.

Los resultados de las pruebas bioquímicas se resumen en el cuadro 1, comparándose con aquellos obtenidos con las cepas de referencia.

J Copes, S Acosta Lualdi, K Pellicer, NO Stanchi, JC Perfumo.

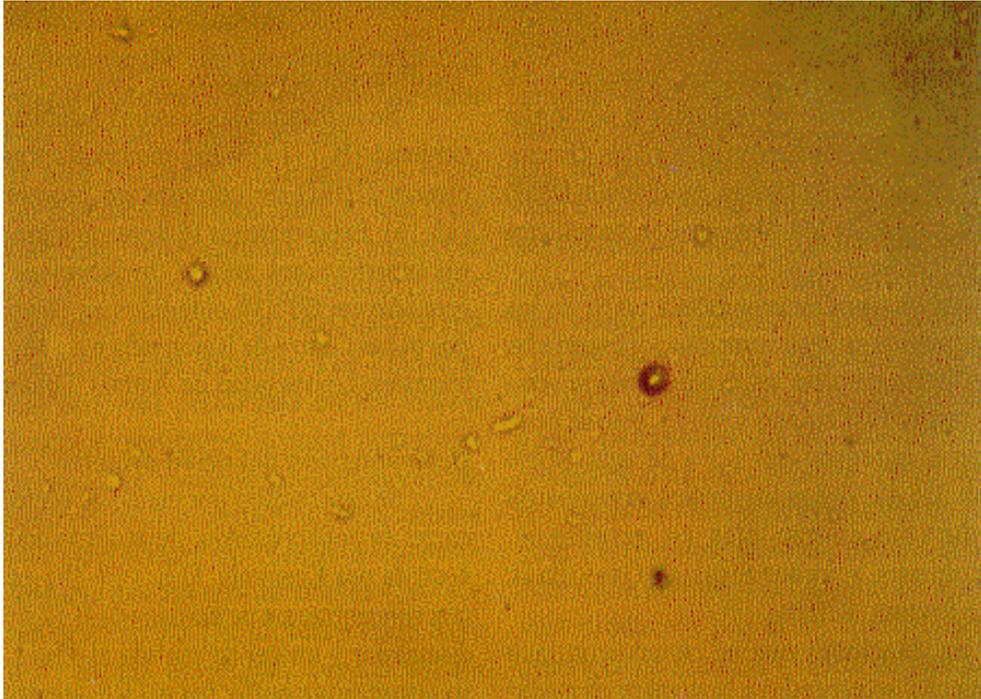


Figura 1.- Crecimiento de las cepas aisladas en aerobiosis.

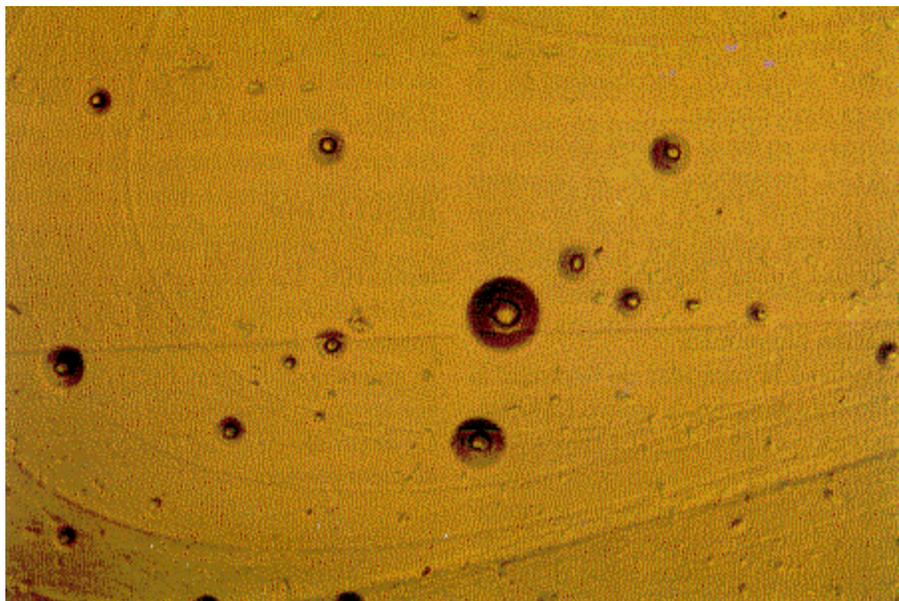


Figura 2.- Crecimiento de las cepas en anaerobiosis.

Cuadro 1
Características bioquímicas comparativas entre las cepas de referencia utilizadas y las cepas aisladas.

Cepas	Glucosa (1)	Arginina (2)	Tetrazolium (3)	Fosfatasa (4)	Digitonina (5)	Film & Spot (6)
Cepas A y B	-	+	-	-	-	+
Cepa C	+	-	-	-	+	-
<i>M. hyosynoviae</i> S16	-	+	-	-	-	+
<i>M. hyorhinae</i> BTS7	+	-	+	+	-	-
<i>M. hyorhinae</i> PG29	+	-	+	+	-	-
<i>A. granularum</i>	+	-	-	-	+	-

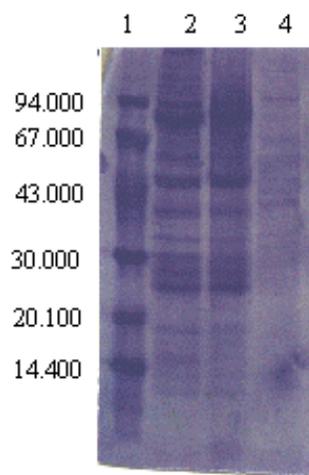
(1) fermentación, (2) hidrólisis, (3) reducción, (4) producción, (5) desarrollo, (6) producción.

Pruebas de inhibición de crecimiento y epifluorescencia indirecta.

Con las cepas identificadas A y B no se observaron halos de inhibición con los sueros anticepas de referencia de *M. hyosynoviae*, *A. granularum* y *M. hyorhinae*. La cepa C produjo un halo bien manifiesto de aproximadamente 5 mm de diámetro con el suero anti *A. granularum* BTS39. Los sueros de referencia inhibieron en las colonias de las cepas homólogas y en las colonias de las cepas A y B. En la cepa clasificada como C se comprobó fluorescencia con el suero anti *A. granularum*.

Perfiles proteicos

Se comprobó la existencia de patrones proteicos equiparables entre las cepas A y B con la cepa *M. hyosynoviae* S16. Con relación a la cepa A y B, la diferencia se ubicó en la banda de 96000



Referencia: 1 Marcador de peso molecular, 2: S16 de *M. hyosynoviae*, 3: Cepa aislada A, 4: *A. granularum*.

Figura 3.- Perfil electroforético de las cepas S16 de *M. hyosynoviae*, cepa aislada y *A. granularum*.

J Copes, S Acosta Lualdi, K Pellicer, NO Stanchi, JC Perfumo.

Da. En el caso de la cepa C, el perfil proteico muestra gran similitud con *A. granularum* BTS39 (figura 3).

DISCUSIÓN.

Numerosos trabajos confirman el aislamiento de *M. hyosynoviae* a partir de cavidad nasal, tráquea, tonsilas y pulmón, considerándolo como un habitante normal, pero a su vez, hacen resaltar la importancia de la vía nasofaríngea como fuente de diseminación de este agente a partir de animales portadores y de puerta de entrada en cerdos susceptibles (1, 2, 20, 21). Diversos autores (3, 4, 7) le asignan un papel etiológico al aislamiento de *M. hyosynoviae* a partir de cerdos de más de 30 kg de peso con síntomas clínicos de poliartritis. Las cepas de mycoplasmas obtenidas de articulación en el presente trabajo, correspondieron a cerdos que presentaban sintomatología compatible con la enfermedad. Estos animales fueron separados del resto de la piara, con la finalidad de intentar reaislar el germen en etapas subsiguientes. Los resultados obtenidos dos meses más tarde fueron nulos. Estos datos concuerdan con los informados por Friss y col. (2) acerca de que el diagnóstico por medio del aislamiento es factible en el período agudo de la enfermedad.

Las cepas aisladas A y B, mostraron un buen desarrollo en medio HM con la adición del 5% de mucina. La incubación en anaerobiosis favoreció el crecimiento de *M. hyosynoviae* en medio sólido (22). El promedio de tiempo requerido para la visualización de colonias fue de cuatro días para *M. hyosynoviae*. Referente a *A. granularum* fue de dos días, esto indicaría también una clara diferencia entre estas dos especies. Pero en el caso de *M. hyorhinitis* (agente etiológico de la artritis con poliserositis en animales jóvenes), no sería tan clara, ya que puede desarrollarse en dos días y produce fermentación de la glucosa. Creemos estas consideraciones de importancia, para implementar en la rutina de aislamiento de microorganismos de los géneros *Mycoplasma* y *Acholeplasma*, las pruebas de requerimiento de colesterol y de desarrollo

en presencia de digitonina.

Los resultados obtenidos con la caracterización bioquímica, serológica y la comparación de los perfiles proteicos de las cepas A, B y C, con las cepas de referencia de *M. hyosynoviae* y *A. granularum* permiten clasificar a los nombrados aislamientos como *M. hyosynoviae* (cepas A y B) y *A. granularum* (cepa C).

Con respecto a la prueba de EIFI, las colonias de las cepas *M. hyosynoviae* S16, A y B mostraron fluorescencia específica solamente cuando se enfrentaron con el antisuero de referencia anti-S16.

Estos resultados indicarían según lo descrito por Whittlestone y col. (20), que la técnica de EIFI aplicada a colonias es lo indicado para la identificación de *M. hyosynoviae* en aislamientos a campo.

Mediante la prueba de IC, los resultados obtenidos con las cepas de *M. hyosynoviae* no fue de ayuda para su caracterización. Esto es debido a la gran diversidad existente en las cepas aisladas a campo (Whittlestone 1979) referente a la cepa *A. granularum* BTS39 y la cepa C, los halos de inhibición producidos fueron similares y claros. Esto indicaría que la prueba de IC aplicada a la identificación de *A. granularum* sería adecuada para la tipificación del mismo.

El estudio comparativo de los perfiles proteicos entre las cepas aisladas y la cepa de referencia *M. hyosynoviae* S16, mostró gran similitud, por lo cual esta prueba tendría un valioso uso para la caracterización, teniendo en cuenta que las cepas aisladas como las de referencia deben ser procesadas de igual manera para obtener perfiles proteicos valederos para una clasificación (20).

La implementación de esta metodología permitió el aislamiento de *M. hyosynoviae* y *A. granularum* a partir de cerdos con lesiones articulares, por primera vez en Argentina. Consideramos lo expuesto de gran valor, ya que en el futuro Veterinarios y Productores deberán tener en cuenta esta entidad patológica en la producción de cerdos.

REFERENCIAS.

1. Ross RF. Mycoplasmal Diseases. En: Diseases of Swine. 7ma. edición. Ed. Leman A, Straw B, Mengeling M, D'Allaire S, Taylor D. Des Moines: Iowa University Press/Ames; 1992. p. 545-547.
2. Friss N. Mycoplasmas in pigs with special regard to the respiratory tract. DSR Forlag, Royal Veterinary and Agricultural University. Copenhagen. Thesis. 1974.
3. Friss NF, Hansen K, Chimer A, Aabo S. *Mycoplasma hyosynoviae* in joints with arthritis in abattoir baconers. Acta Vet Scand 1992; 33:205-10.
4. Ross RF, Switzer W, Duncan JR. Experimental production of *Mycoplasma hyosynoviae* in swine. Am J Vet Res 1971; 32:1743-49.
5. Cole CB, Washburn L, Tyler-Robinson L. Mycoplasma arthritis. En The Mycoplasmas IV. Mycoplasma Pathogenicity. Ed. Razin S, Barile M. New York: Academic Press 1985. p. 108-52.
6. Switzer. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Mycoplasmas. Sección 10. Ed. Noel Krieg-John Holt Baltimore: Williams & Wilkins; 1984. p. 779-984.
7. Ross RF, Karmon JA. Heterogeneity among strains of *Mycoplasma granularum* and identification of *Mycoplasma hyosynoviae* sp. J Bacteriol 1970; 103:707-13.
8. Tully J. Serum Free Broth Medium. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Mycoplasmas. Sección 10. Ed. Noel Krieg-John Holt Baltimore: Williams & Wilkins; 1984. p. 775-81.
9. Barile, M Arginine Hydrolysis En Methods in Mycoplasmology. Vol 1. Mycoplasma Characterization. Editores: Razin, S y Tully, J. New York: Academic Press; 1983. p. 345-50.
10. Senterfit L. Tetrazolium Reduction. Methods in Mycoplasmology. Mycoplasma characterization. Ed. Razin S y Tully J. New York: Academic Press; 1983. p. 337-78.
11. Bradbury J. Phosphatase Activity. En Methods in Mycoplasmology Vol 1. Mycoplasma Characterization. Ed. Razin S y Tully J. New York: Academic Press; 1983. p. 363-6.
12. Freundt EA, Film and Spot Production. Methods in Mycoplasmology. Vol 1. Mycoplasma Characterization. Ed. Razin S y Tully J. New York: Academic Press; 1983. p. 373-74.
13. Tully J. Test for digitonin sensitivity and seterol requeriment. En: Methods in Mycoplasmology. Mycoplasma characterization. Ed. Razin S y Tully J. New York: Academic Press 1983. p. 355-64.
14. Wallace AC Jr. Growth inhibition Test. Methods in Mycoplasmology. Mycoplasma characterization. Ed. Razin S y Tully J. New York: Academic Press 1983. p. 405-10.
15. Bencina D, Bradbury J. Combination of immunofluorescence and immunoperoxidase techniques for serotyping mixtures of Mycoplasma species. J Clin Microbiol 1992; 30:407-10.
16. Gardella R, DelGiudice R, Tully J. Immunofluorescens. Methods in Mycoplasmology. Mycoplasma characterization. Ed. Razin S y Tully J. New York: Academic Press 1983. p. 431-40.
17. Laemmly U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) 1970; 22:680-5.
18. Mouches C, Bové J. Electroforetic characterization of Mycoplasma proteins. Methods in Mycoplasmology. Mycoplasma characterization. Ed. Razin S y Tully J. New York: Academic Press 1983. p. 241-56.
19. Imada Y, Harasawa R, Kotari H, Koshimizu K. Sodium dodecyl sulfate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis and Western Blotting Analyses of Ureaplasmas Isolated from dogs. J Vet Med Sci 1992; 54, 2:325-8.
20. Whittlestone P. Porcine Mycoplasmas. The Mycoplasmas II. Human and Animal Mycoplasmas. Ed. Tully JG, Whitcomb RF. New York: Academic Press 1979. p. 133-76.
21. Copes J, Nievas F, Cerdá R, Perfumo C. Aislamiento y caracterización de Mycoplasma sp. de pulmones de cerdos provenientes de mataderos. Analecta Veterinaria 1995; 15: 1:27-30.
22. Ogata M, Karamura S, Yamamoto K. Selective isolation of *Mycoplasma hyosynoviae* by anaerobic cultivation. Jpn J Vet Sci 1982;44:725-39.