

**UNIVERSIDAD NACIONAL**  
**SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**  
**POSGRADO REGIONAL EN CIENCIAS VETERINARIAS TROPICALES**



**Detección y caracterización molecular de especies de *Mycoplasma* en animales domésticos y silvestres de Costa Rica.**

**Javier Enrique Varela Amador**

**Universidad Nacional, Heredia 2025**

**Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales para optar por el grado académico de *Magíster Scientiae* en Enfermedades Tropicales.**

**Detección y caracterización molecular de especies de *Mycoplasma* en animales domésticos y silvestres de Costa Rica.**

**Javier Enrique Varela Amador**

**Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales para optar por el grado académico de *Magíster Scientiae* en Enfermedades Tropicales.**

## **Miembros del Tribunal Examinador**

M.Sc. Randall Gutiérrez Vargas / Dra. Damaris Castro García / Dr. Jorge Herrera  
Murillo / Dr. José Vega Baudrit / Dr. Greivin Rodríguez Calderón / Dra. Rocío Castillo  
Cedeño

Representante del Consejo Central de Posgrado

M.Sc. Silvia Argüello Vargas  
Coordinadora del Posgrado o su representante

Dra. Gaby Dolz Wiedner  
Tutora de tesis

Dr. Elías Barquero Calvo  
Miembro del Comité Asesor

Dr. Juan José Romero Zúñiga  
Miembro del Comité Asesor

Javier Enrique Varela Amador  
Sustentante

## RESUMEN GENERAL

*Mycoplasma* es una bacteria de tamaño reducido, pleomórfica que carece de pared celular. En la actualidad se han identificado más de 100 especies a nivel mundial, colonizando humanos, mamíferos, peces, reptiles, artrópodos y plantas. El presente estudio se dividió en dos partes, el objetivo de la primera parte fue identificar la presencia de especies de *Mycoplasma* en mucosas y sangre de animales silvestres y domésticos de Costa Rica. Mediante un estudio transversal descriptivo se analizaron un total de 529 muestras de ADN de sangre, semen, hisopados bucotraqueales de animales silvestres y domésticos, recolectados entre enero y septiembre del 2023 (n=75) o provenientes de bancos de ADN (n=454) mediante cinco técnicas moleculares (reacción en cadena de la polimerasa [PCR]) para la detección del gen ARNr 16S de la clase *Mollicutes* y de *Mycoplasma canadense*, del gen *rpo β* de *Mycoplasma californicum* y de *Mycoplasma bovigenitalium*, y del gen *uvrC* de *Mycoplasma bovis* y secuenciación. Un total de 11,2% (59/529) muestras resultaron positivas en el PCR que amplificó el gen ARNr 16S de la clase *Mollicutes*. Los resultados de secuenciación identificaron cuatro especies de *Mycoplasma*; *Mycoplasma salivarium* en 22,2% (6/27) de primates no humanos, *Mycoplasma hyorhinis* en 84,6% (11/13) de cerdos, “*Candidatus Mycoplasma turisencis*” en 3,1% (5/161) de gatos domésticos y *Mycoplasma haemocanis* en 9,0% (1/11) de mapaches. Además, se estableció la presencia de especies de *Mycoplasma* en un 30,0% (21/70) de muestras de semen bovino; *M. canadense* en 33,3% (7/21), *M. californicum* en 19,0% (4/21), y *M. bovigenitalium* en 47,6% (10/21) muestras, dos bovinos mostraron infección mixta de *M. bovigenitalium* - *M. canadense* y un bovino de *M. californicum* – *M. bovigenitalium*. El presente estudio estableció por primera vez la presencia de siete especies de *Mycoplasma* en animales silvestres y domésticos de Costa Rica y Centroamérica. Se recomienda estudiar su impacto sobre la salud de los animales infectados.

El objetivo de la segunda parte fue estimar la frecuencia de especies de *Mycoplasma* y de otras bacterias aisladas, mediante técnicas moleculares y cultivo tradicional, respectivamente, a partir de leche de vacas con mastitis y leche de tanque de fincas lecheras especializadas de Costa Rica. Se analizaron un total de 695 muestras de leche y 132 muestras de leche de tanque, las cuales fueron recolectadas entre marzo y junio de 2023. Para la detección de *Mycoplasma* spp. y *M. canadense* se amplificaron los genes ARNr 16S, para *M. californicum* y *M. bovigenitalium* los genes *rpo β* y para *M. bovis* el

gen uvrC. Además, se obtuvo la siguiente información de cada muestra de leche individual: especies de bacterias aisladas en el cultivo y resultado del antibiograma para cada aislamiento. Se detectó por primera vez en Costa Rica la presencia de *M. californicum* en una muestra compuesta de leche de vaca, las demás muestras analizadas resultaron negativas. En las muestras de leche con mastitis se evidenció la presencia de 66 especies de bacterias, agrupadas a conveniencia en 11 grupos diferentes, identificándose *Staphylococcus no aureus*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, y *Escherichia coli* como las bacterias más frecuentemente aisladas. Se observó una alta resistencia de *S. aureus* a enrofloxacin (96%) y de *S. uberis* a penicilina (15,6%), lo que subraya la importancia de considerar la resistencia bacteriana en el tratamiento de la mastitis. Este estudio demuestra que, aunque *Mycoplasma* tiene una presencia baja en Costa Rica, no debe dejar de pensarse como una causa de mastitis pudiendo causar impacto en la salud del ganado y la producción lechera, especialmente en casos de vacas con mastitis refractarias a tratamientos que han demostrado eficacia para casos similares en fincas.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia, principalmente a mis padres por siempre brindarme el apoyo necesario, por creer y confiar en mí más de lo que yo mismo puedo.

Al Dr. Wilfredo Sosa-Ochoa por su amistad y por el apoyo que siempre me ha dado.

A mi mejor amigo Samael, por demostrarme que la amistad, la lealtad, y la integridad a pesar de ser intangibles siempre dejan huella, hasta llegar al nivel de traspasar el tiempo y el espacio.

A las Fuerzas Armadas de Honduras por el apoyo brindado para continuar formándome fuera de mi carrera militar.

Al Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD) por otorgarme la beca para poder cursar mis estudios de posgrado.

A la Dra. Gaby Dolz por ser mi tutora en este proyecto de tesis.

A mis amigos Kimberly, Isaac, María José y Gaby por todo el tiempo compartido, por el apoyo, las vivencias y los recuerdos que se quedaron en mi mente y mi corazón por el resto de mis días.

A mis lectores el Dr. Elías Barquero y Dr. Juan José Romero por su asesoramiento para mejorar este proyecto.

Al personal del Laboratorio de Zoonosis, María José Zuniga, Sergio Alfaro y Antony Solorzano por el apoyo y las enseñanzas.

A todas las personas que me brindaron su amistad y apoyo durante mi estadía en Costa Rica.

## **DEDICATORIA**

Este trabajo se lo dedico a mi madre y a mi padre por siempre apoyarme en todas las decisiones que he tomado, por impulsarme a ser mejor, por enseñarme a trabajar e inculcarme valores que me hacen ser un hombre y un profesional con mucho honor. A mis abuelos, que después de mis padres han sido las personas que me han encaminado a lo largo de mi vida, a mis hermanos por el respeto y admiración que me demuestran, lo que me hace esforzarme para dar lo mejor de mí.

“Me parece haber sido sólo un niño jugando en la orilla del mar, divirtiéndose y buscando una piedra más lisa o una concha más bonita de lo normal, mientras el gran océano de la verdad yacía ante mis ojos con todo por descubrir”

Isaac Newton (1642 – 1727)

## INDICE

Resumen general.....	iv
Agradecimientos.....	vi
Dedicatoria.....	vii
Lista de cuadros.....	x
Introducción general.....	xi
Historia.....	xi
Etiología.....	xi
Transmisión.....	xii
Patogénesis.....	xiii
Manifestaciones clínicas.....	xiii
Diagnóstico.....	xiv
Tratamiento y profilaxis.....	xv
Epidemiología.....	xv
Bibliografía.....	xix
Artículo I.....	1
1. Introducción.....	3
2. Materiales y métodos.....	4
2.1 Tipo de estudio y población.....	4
2.2 Tamaño y tipo de muestra.....	5
2.3 Extracción de ADN de muestras de sangre e hisopados.....	6
2.4 Detección molecular de especies de <i>Mycoplasma</i> .....	7
3. Resultados.....	9
4. Discusión.....	11
5. Conclusiones.....	13
6. Recomendaciones.....	14
7. Bibliografía.....	14
Artículo II.....	20
1. Introducción.....	22
2.1 Tipo de estudio, tipo de muestra e información de las muestras.....	25
2.2 Tamaño y tipo de muestra.....	26
2.3 Extracción de ADN.....	26
2.4 Detección molecular de especies de <i>Mycoplasma</i> .....	26
2.4.1 PCR en tiempo real (qPCR) para la detección de <i>M. bovis</i> .....	26
2.4.2 PCR para detección de <i>Mycoplasma</i> spp.....	27

2.4.3 PCR para detección de <i>M. canadense</i> , <i>M. californicum</i> y <i>M. bovigentialium</i> .....	27
2.4.4 Visualización de productos amplificados y secuenciación.....	28
3. Análisis estadístico .....	28
4. Resultados.....	28
5. Discusión .....	31
6. Conclusiones.....	34
7. Recomendaciones .....	34
8. Bibliografía .....	35
Discusión general .....	40
Conclusiones generales.....	44
Recomendaciones generales .....	45
Anexos.....	46

## **Lista de cuadros**

### **Introducción general**

Cuadro 1: Especies de *Mycoplasma* que afectan a los animales, manifestaciones clínicas, tropismo y riesgo zoonótico.....xvi

### **Artículo I**

Cuadro 1: Desglose de las muestras analizadas, por especie animal, tipo de muestra y procedencia.....5

Cuadro 2: Secuencias de los productos amplificados del gen ARNr 16S de la clase *Mollicutes* mediante PCR a partir de muestras de animales domésticos y silvestres.....9

Cuadro 3. Especies de *Mycoplasma* determinadas en semen de bovinos mediante el uso de PCRs específicos para *M. californicum*, *M. bovigenitalium*, *M. canadense*.....11

### **Artículo II**

Cuadro 1. Bacterias aisladas en muestras de leche de vacas especializadas con mastitis clínica, marzo a junio 2023 en Costa Rica.....29

Cuadro 2. Resistencia a antibióticos determinada en cepas de *Streptococcus* spp. aisladas de muestras de leche de vacas con mastitis clínica, marzo a junio 2023, Costa Rica.....30

Cuadro 3. Resistencia a antibióticos determinadas en cepas de *Staphylococcus* spp, y otras bacterias Gram positivas aisladas de muestras de leche de vacas especializadas con mastitis clínica, marzo-julio 2023, Costa Rica.....30

Cuadro 4. Resistencia a antibióticos determinadas en cepas de bacterias Gram negativas aisladas de muestras de leche de vacas especializadas con mastitis clínica, marzo-julio 2023, Costa Rica.....31

## **Introducción general**

### **Historia**

Las bacterias del género *Mycoplasma* se identificaron por primera vez como agentes causales de pleuroneumonía en bovinos en 1898 (Rufo et al., 2021). Inicialmente se consideraron agentes virales, sin embargo, en 1935, se lograron aislar colonias en forma de "huevo frito" contaminando un cultivo de *Streptobacillus moniliformis* (Harwick et al., 1972). *Mycoplasma* es una bacteria con gran dispersión en fauna y flora, ya que hasta la fecha se han aislado en más de 100 especies de mamíferos, aves, reptiles, plantas e insectos, unos considerados comensales y otros patógenos, y algunos con potencial zoonótico (Sawicka-Durkalec et al., 2021).

*Mycoplasma* se dividen en dos grupos, de acuerdo a sus características biológicas y filogenéticas; un grupo se denomina *Mycoplasma* de las mucosas y el otro hemoplasmas, por su tropismo para mucosas y glóbulos rojos, respectivamente (Rodríguez-Mirabal et al., 2021). El grupo de *Mycoplasma* de las mucosas tienen un mayor potencial patógeno e impacto económico, y afectan la salud de los animales de producción (Deeney et al., 2021); en contraste con los hemoplasmas, que parecen ocasionar anemia (Peters et al., 2008).

*Mycoplasma bovis* es una micoplasma de mucosas que ocasiona un gran impacto económico en la producción. Esta bacteria fue aislada por primera vez en Estados Unidos en 1961, a partir de un caso de mastitis, y se cree que se distribuyó a nivel mundial mediante la exportación de ganado (Dudek et al., 2020). Existen otras especies como *Mycoplasma canadense*, *Mycoplasma californicum*, *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma bovigenitalium*, *Mycoplasma bovirhinis*, y *Mycoplasma alkalenses*, que también se relacionan con enfermedad clínica (Sosa et al., 2018). Las enfermedades que ocasionan estos micoplasmas son enfermedades respiratorias y reproductivas, mastitis, artritis y otitis media (Nicholas & Ayling, 2003). El control es difícil, debido a la presencia de portadores sanos y a la falta de métodos de diagnóstico (Malmberg et al., 2020).

### **Etiología**

*Mycoplasma* es una bacteria que pertenece al filo *Firmicutes*, clase *Mollicutes*, orden *Mycoplasmatales* y familia *Mycoplasmatacea*. Filogenéticamente están relacionados con las bacterias Gram positivas (Minion, 2002), se caracterizan por no poseer pared celular

y por tener un bajo contenido de guanina y citocina. Debido a la carencia de pared celular, poseen resistencia natural a los antibióticos que actúan sobre la síntesis de la pared. Se consideran además, los organismos procariontes auto replicativos con los genomas más pequeños (500 a 1000 genes), y se caracterizan por poseer una cantidad mínima de organelas para el crecimiento y la replicación, que hacen que su cultivo sea difícil debido a su complejo requerimiento nutricional (Gautier-Bouchardon, 2018).

Las bacterias del género *Mycoplasma* son microorganismos intracelulares facultativos, y de acuerdo con sus capacidades bioquímicas se pueden dividir en dos grupos: fermentadores de glucosa o hidrolizantes de arginina. La mayoría de micoplasmas se consideran comensales, las patógenas son las que poseen un orgánulo terminal que les ayuda adherirse e interferir con el metabolismo de las células que infectan (Meseguer-Peinado et al., 2012). Este se considera el principal factor de virulencia. Las cepas mutantes que carecen de adhesinas se consideran avirulentas. El invadir células no fagocíticas y permanecer en forma intracitoplasmática alrededor del núcleo les brinda protección del sistema inmunológico y de algunos antibióticos (Rottem, 2003).

### **Transmisión**

Las micoplasmas de las mucosas se transmiten por contacto directo con animales infectados. En los animales infectados las bacterias se diseminan vía linfática, para ser eliminadas en secreciones y excreciones, por ejemplo, en secreciones oculares, nasales, vaginales, orina y heces. La bacteria ingresa a una finca generalmente por animales portadores asintomáticos. Animales con infección crónica (neumonía) pueden transmitir las micoplasmas mediante aerosoles, y las vacas pueden pasar el agente a sus terneros mediante la leche (Gelgie et al., 2022; Pijoan et al., 2006). En Finlandia se determinó el semen como fuente de infección para vacas que desarrollaron mastitis. El agente se logró aislar de semen congelado y se determinó que sobrevivía procesos de fertilización *in vitro*, infectando los embriones y reduciendo la capacidad de penetración de los espermias (García-Galán et al., 2020).

Los hemoplasmas se transmiten principalmente por el contacto con sangre infectada y además pueden ser transmitidos por artrópodos y vectores hematófagos (Prullage et al., 1993; Westmoreland et al., 2017). También se ha establecido transmisión vertical (intrauterina o por el contacto con sangre o secreciones durante el parto), sobre todo en cerdos, estas micoplasmas muestran tropismo por eritrocitos (Stadler et al., 2019).

Un estudio realizado por Dhondt y colaboradores (2007) investigó la transmisión de micoplasmas de aves a través de fómites. El estudio demostró que una contaminación experimental de comederos y posterior exposición de aves, ocasionó signos clínicos en las aves durante 24 horas y una temperatura de 21 a 23 °C, sin embargo, la enfermedad fue más leve que en aves infectadas por contacto directo, posiblemente por la pérdida de la capacidad de infectividad de la bacteria en los fómites (Dhondt et al., 2007).

### **Patogénesis**

Los principales factores de virulencia de las micoplasmas son las adhesinas, además, producen desechos metabólicos tóxicos (peróxido de hidrógeno y anión superóxido) que afectan las células del huésped, y tienen la característica de que inhiben la capacidad catalasa de las células, de esta forma aumentan los niveles de peróxido de hidrógeno. El sistema inmune del huésped favorece la patogénesis, activando macrófagos, linfocitos, y la producción de citocinas (Hund, 2015). Un ejemplo de esto es el reclutamiento de células epiteliales con células inflamatorias en las vías aéreas, lo que genera infiltración celular, por acción de la interleucina 8, una potente quimiocina de neutrófilos (Gonzalo de Liria & Hernández, 2013).

En la actualidad se han identificado tres adhesinas de importancia en la patogénesis de *Mycoplasma*:  $\alpha$ -enolasa, NADH oxidasa (NOX) y metilentetrahidrofolato-ARNt-(uracil-5-)-metiltransferasa (TrmFO), que se unen al plasminógeno y la fibronectina, lo que sirve como puente entre las adhesinas bacterianas y los receptores en la célula huésped (Guo et al., 2017; Hao et al., 2022; Josi et al., 2018). En el caso de las micoplasmas con tropismo por los glóbulos rojos, inducen una muerte celular programada (Sonlío et al., 2021). El cambio que ocurre en los eritrocitos es llamado eriptosis, que se caracteriza por el encogimiento de las células, a causa de la formación de ampollas en la superficie de la membrana, lo cual activa las proteasas. La exposición de fosfatidilserina en la membrana ocasiona la fagocitosis por macrófagos (Lang et al., 2006).

### **Manifestaciones clínicas**

Las manifestaciones clínicas varían según la especie de *Mycoplasma* infectante. Las micoplasmas que afectan las mucosas generalmente presentan una alta gama de manifestaciones clínicas (Tardy et al., 2020), en animales son causal de enfermedades respiratorias como neumonía (Clavijo et al., 2021), además se han asociado a

enfermedades como artritis, conjuntivitis y poliseritis (Ferreira et al., 2021). En el caso de las micoplasmas hemotrópicas, afectan tanto a animales silvestres como domésticos (Felder et al., 2011). Además, causan enfermedades que van desde anemias asintomáticas a crónicas por la ruptura del glóbulo rojo por la acción de la adhesina del micoplasma (Ikeda et al., 2017).

En bovinos, *Mycoplasma* se ha identificado como agente causal del complejo de enfermedades respiratorias y de mastitis (Register et al., 2018). En recientes investigaciones también se ha asociado con endocarditis, debido a su diseminación por vía hematológica (Kanda et al., 2019). Además, se relaciona con la aparición de artritis (Hananeh et al., 2018), otitis media severa (Foster et al., 2009), y se ha identificado como causal de neumonías crónicas (Fox, 2012). En bovinos machos la infección del tracto urinario podría conllevar a una infección testicular que se puede manifestar con orquitis (Nicholas & Ayling, 2003).

### **Diagnóstico**

El diagnóstico directo se realiza mediante cultivo y es considerado como el estándar de oro. Dada la cantidad mínima de organelas que poseen, se deben utilizar medios especiales para satisfacer los requerimientos nutricionales de estas bacterias (Gautier-Bouchardon, 2018). Los medios más comunes utilizados para el aislamiento de *Mycoplasma* son el medio Hayflick (Cerdá et al., 2000), medio SP-4 Tully (Meseguer-Peinado et al., 2012), medio *Mycoplasma* Base Medium con el suplemento Selective *Mycoplasma* – MM (Cantón et al., 2022). Además, se recomienda realizar adicionalmente pruebas bioquímicas, como prueba de sensibilidad a la digitonina, útil para diferenciar las micoplasmas del género *Acholeplasma*, y las pruebas de fermentación de la glucosa, hidrólisis de la arginina y reducción del tetrazolium (Cerdá et al., 2000).

Para lograr el aislamiento de las micoplasmas, éstas se inoculan en los medios antes mencionados y se incuban durante 7 a 10 días a 37 °C y 5% a 10% de CO<sub>2</sub>. El cultivo tiene la ventaja de ser un método tradicional, simple y de bajo costo, pero tiene la desventaja de ser lento y de baja sensibilidad, es por eso que el diagnóstico para *Mycoplasma* se basa principalmente en el uso de técnicas moleculares, principalmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Meseguer-Peinado et al., 2012).

El diagnóstico molecular de *Mycoplasma* se realiza generalmente amplificando partes de los genes 23 S ARNr (Hotzel et al., 2003), 16 S ARNr (Ramírez et al., 2008), las regiones 16S–23S rADN, y la región del espacio intergénico (ISR) (Vega-Orellana et al., 2017). Para el diagnóstico de *M. bovis* se amplifica además el gen conservado *uvrC* (proteína de reparación) (Thomas et al., 2004). También se ha reportado el uso de otras técnicas diagnósticas directas como la inmunohistoquímica y la hibridación *in situ* (Dudek et al., 2020).

El diagnóstico indirecto se realiza detectando anticuerpos tipo IgG, IgM e IgA en sueros, que suelen ser diagnosticados alrededor de los siete días después del inicio de la enfermedad (Zhang et al., 2011). Aunque el diagnóstico serológico es más sensible que el cultivo, pueden ocurrir resultados falsos positivos y reacciones cruzadas (Haaheim et al., 2001). La medición de anticuerpos solo tiene utilidad en estudios epidemiológicos (Maunsell et al., 2011).

### **Tratamiento y profilaxis**

*Mycoplasma* es naturalmente resistente a los antibióticos betalactámicos, glucopéptidos, fosfomicina, rifampicina, polimixinas, sulfonamidas, quinolonas de primera generación (ácido nalidíxico) y trimetoprima (Gautier-Bouchardon, 2018; Taylor-Robinson & Bébéar, 1997). El tratamiento de elección es doxiciclina (Murray et al., 2014) y fluoroquinolonas (Díaz et al., 2005), también se realiza con eritromicina y tetraciclina. Actualmente existen vacunas contra algunas especies de *Mycoplasma*, pero tienen una baja efectividad (Dudek et al., 2021). Las vacunas vivas atenuadas contra especies de micoplasmas que infectan a los cerdos, utilizan proteínas de superficie, de envoltura y adhesinas, su uso ha sido autorizado en países como China y México, pero sólo inducen una protección parcial (Maes et al., 2021). Para *M. bovis* se utilizan vacunas inactivadas, pero tienen la desventaja de que su costo de producción es muy elevado, debido a que el cultivo de la cepa vacunal es difícil, además no muestra un alto nivel de protección (Dudek et al., 2021).

### **Epidemiología**

Las diferentes especies de *Mycoplasma* (Cuadro 1) tienen distribución mundial (Murray et al., 2014), y pueden generar patología, independientemente de la estación del año o de condiciones geográficas como altura y clima (Atkinson et al., 2008). Sobre todo en

Europa y Asia se han reportado la presencia de especies de *Mycoplasma* en animales domésticos y silvestres, así, por ejemplo, en Letonia se encontraron tres especies de *Mycoplasma* hemotrópicas en gatos (*'Candidatus Mycoplasma haemominutum'*, *Mycoplasma haemofelis*, y *'Candidatus Mycoplasma turicensis'*) (Berzina et al., 2021), mientras que en Tailandia se estableció un 27,7% (64/231) de gatos positivos a hemoplasmas mediante la técnica de PCR amplificando el gen ARNr 16S y confirmando mediante secuenciación la presencia de *M. haemofelis* (9/231), "*Ca. M. haemominutum*" (53/231), y "*Ca. M. turicensis*" (2/231) (Kaewmongkol et al., 2020).

**Cuadro 1.** Especies de *Mycoplasma* que afectan a los animales, manifestaciones clínicas, tropismo y riesgo zoonótico

<b>Especie</b>	<b><i>Mycoplasma</i></b>	<b>Manifestaciones clínicas</b>	<b>Tropismo</b>	<b>Potencial zoonótico</b>	<b>Referencia</b>
<b>Bovinos</b>	<i>M. bovis</i>	Bronconeumonía	Mucosa	No	Gautier-Bouchardon, 2018 Neder et al., 2022
	<i>M. canadense</i>	enzoótica			
	<i>M. californicum</i>	infecciosa,			
	<i>M. bovis genitalium</i> <i>M. bovirhinis</i>	mastitis, artritis, otitis			
<b>Pollos, pavos</b>	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	Enfermedad respiratoria	Mucosa	No	Gautier-Bouchardon, 2018
	<i>Mycoplasma sinoviae</i>	crónica, sinusitis infecciosa			
<b>Aves silvestres</b>	<i>Mycoplasma sturni</i>	Infecciones respiratorias,	Mucosa	No	Sawicka-Durkalec et al., 2021
	<i>Mycoplasma buteonis</i>	artritis			
	<i>Mycoplasma corogypsi</i>				
	<i>Mycoplasma falconis</i>				
	<i>Mycoplasma gypsis</i>				
<b>Cerdos</b>	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	Neumonía enzoótica	Mucosa	No	Gautier-Bouchardon, 2018
	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	Poliserositis, artritis, neumonía	Mucosa	No	
	<i>Mycoplasma hyosinoviae</i>	Artritis, poliartritis	Mucosa	No	
	<i>Mycoplasma suis</i>	Anemia hemolítica aguda o crónica	Eritrocitos	Sí	
<b>Gatos</b>	<i>Mycoplasma haemofelis</i>	Anemia infecciosa	Eritrocitos	No	Braga et al., 2012; Kewish et al., 2004; Novacco et al., 2013
	<i>'Candidatus Mycoplasma haemominutum'</i>				

	<i>'Candidatus Mycoplasma turicensis'</i>				
	<i>Mycoplasma felis</i>	Conjuntivitis, artritis	Mucosa	No	Kinoshita et al., 2020; Liehmann et al., 2006
<b>Perros</b>	<i>Mycoplasma haemocanis</i>	Anemia hemolítica	Eritrocitos	No	Barbosa et al., 2021
	<i>'Candidatus Mycoplasma haematoparvum'</i>	Anemia infecciosa	Eritrocitos	No	Roblejo-Arias et al., 2022
	<i>Mycoplasma cynos</i>	Enfermedad respiratoria	Mucosa	No	Day et al., 2020
<b>Tortugas</b>	<i>Mycoplasma agassizii</i>	Enfermedad del tracto respiratorio superior	Mucosas	No	Cozad et al., 2020
	<i>Mycoplasma testudineum</i>	Rinitis crónica y conjuntivitis	Mucosa	No	
<b>Serpientes</b>	<i>Mycoplasma caviae</i>	Enfermedades respiratorias	Mucosas	No	Schmidt et al., 2013
	<i>Mycoplasma fermentans</i>				
<b>Murcielagos</b>	<i>'Candidatus Mycoplasma hemominiopterus'</i>	Anemia	Eritrocitos	No	Millán et al., 2015
	<i>'Candidatus Mycoplasma hemohominis'</i>	Anemia	Eritrocitos	Sí	
<b>Monos</b>	<i>'Candidatus Mycoplasma kahanei'</i>	Anemia	Eritrocitos	No	Ramalho et al., 2017
	<i>'Candidatus Mycoplasma hemomacaque'</i>				
	<i>'Candidatus Mycoplasma aoti'</i>				
<b>Ovejas y cabras</b>	<i>Mycoplasma ovis</i>	Anemia	Eritrocitos	Sí	Martínez-Hernández et al., 2019

<b>Venados</b>	<i>M. ovis</i>	Anemia	Eritrocitos	Sí	André et al., 2020
<b>Mapaches</b>	<i>Mycoplasma hemocanis</i> <i>M. haemofelis</i> ' <i>Candidatus Mycoplasma erythroidelphis</i> '	Anemia	Eritrocitos	No	Volokhov et al., 2017
<b>Jaguares</b>	' <i>Ca. M. turicensis</i> ' <i>M. haemofelis</i> ' <i>Candidatus M. haemominutum</i> '	Anemia	Eritrocitos	No	Furtado et al., 2018

Un estudio en China encontró *Mycoplasma suis* en un 86,0% (148/172) de muestras de cerdo y en un 49,2% (32/65) de muestras de humanos, mediante PCR, amplificando un fragmento del gen ARNr 16S. El análisis filogenético estableció un 98,0% de identidad nucleotídica entre las secuencias amplificadas de cerdos y humanos, demostrando su potencial zoonótico (zoonosis ocupacional) (Yuan et al., 2009).

En Estados Unidos se han reportado un 11,9% de perros (40/345) y un 10,6% de felinos (5/47) positivos a micoplasmas hemotrópicos, confirmados mediante PCR (Levy et al., 2011). Por otro lado, un estudio en Chile determinó un 9,2% de camélidos (8/87) positivos a *Mycoplasma* spp. (Ramos et al., 2021), y en Brasil un 17,8% (78/437) de caninos con hemoplasmas, diagnosticados mediante PCR en tiempo real amplificando el gen ARNr 16S (Barbosa et al., 2021). En Centroamérica solo se encontró un reporte en Costa Rica, de Fritschi et al. (2020), que encontraron *Mycoplasma* spp. en el bazo de un murciélago (*Glossophaga commissarisi*), de un total de 13 animales investigados, utilizando un PCR que amplificó el gen ARNr 16S. El hallazgo se confirmó mediante secuenciación, sin embargo, no permitió identificar la especie (Fritschi et al., 2020).

*M. bovis* también ha sido reportado a nivel mundial, sin embargo, no se considera una especie zoonótica (Sulyok et al., 2018). En Estonia se reportaron positividades entre 0,4% y 12,3% en cuatro grandes rebaños (509 a 1633 animales) utilizando un PCR en tiempo real (qPCR). Los investigadores analizaron muestras compuestas de leche de cinco a cien vacas, esto por la baja prevalencia esperada (Timonen et al., 2020). En Bélgica se determinó una positividad de 1,9% de *M. bovis* en 17 rebaños, analizando un total de 368 muestras individuales de leche (Gille et al., 2020).

En un estudio en Estados Unidos se logró aislamientos en un 1,7% (2757/214518) de muestras de leche, que provenían de 2757 rebaños utilizando medio Hayflick modificado. Un total de 889 aislamientos se analizaron mediante PCR y secuenciación, determinándose un 96,2% como *Mycoplasma* spp. y un 3,8% como *Acholeplasma* spp., siendo *M. bovis* la especie con mayor presencia (75,1% de los casos) (Gioia et al., 2021). En Argentina, Cerdá et al. (2000) analizaron 276 muestras de leche individual, realizando cultivo, pruebas bioquímicas y análisis de proteínas, y lograron identificar a *M. bovis* como agente causal de mastitis en 10 muestras individuales, además se asoció como un importante agente causal de la enfermedad respiratoria bovina (Cantón et al., 2022). De igual manera en Argentina se logró el aislamiento de micoplasmas a partir de lavados bronquiales de terneros sanos o con problemas respiratorios, muestras de leche de vacas con mastitis subclínica o clínica, leche de tanque, y raspados prepuciales de toros sanos. Las colonias se sometieron a pruebas de PCR determinándose la presencia de *M. bovirhinis*, *M. californicum*, *M. bovirgenitalium*, *M. alkalescens*, y *M. arginini* en estas muestras (Sosa et al., 2018). En Brasil se analizó mediante PCR muestras de leche de tanque de 67 hatos, determinándose un 16,0% y un 1,4% de muestras positivas para *Mollicutes* y *M. bovis*, respectivamente (Manzi et al., 2018). Finalmente, en Chile se estableció un 7,0% (5/71) de muestras de leche de tanque positivas a *M. bovis* mediante cultivo bacteriológico (Sickles et al., 2000).

## **Bibliografía**

- Atkinson, T. P., Balish, M. F., & Waites, K. B. (2008). Epidemiology, clinical manifestations, pathogenesis and laboratory detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(6), 956–973. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00129.x>
- Barbosa, M. V., Paulino, P. G., Camilo, T. A., Martins, D., Paulis, L., Senne, N. A., Ramirez, O. L. H., Angelo, I. C., Massard, C. L., & Santos, H. A. (2021). Spatial distribution and molecular epidemiology of hemotropic *Mycoplasma* spp. And *Mycoplasma haemocanis* infection in dogs from Rio de Janeiro, Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, 87, 104660. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104660>
- Berzina, I., Capligina, V., Namina, A., Visocka, A., & Ranka, R. (2021). Haemotropic *Mycoplasma* species in pet cats in Latvia: A study, phylogenetic analysis and clinical case report. *JFMS Open Reports*, 7(2), 20551169211028088. <https://doi.org/10.1177/20551169211028088>
- Cantón, G., Llada, I., Margineda, C., Urtizbiría, F., Fanti, S., Scioli, V., Fiorentino, M. A., Louge Uriarte, E., Morrell, E., Sticotti, E., & Tamiozzo, P. (2022). *Mycoplasma*

bovis-pneumonia and polyarthritis in feedlot calves in Argentina: First local isolation. *Revista Argentina de Microbiología*.  
<https://doi.org/10.1016/j.ram.2022.02.005>

- Cerdá, R., Xavier, J., Sansalone, P., Sota, R. de la, & Rosenbush, R. (2000). Aislamiento de *Mycoplasma bovis* a partir de un brote de mastitis bovina en una vaquería de la provincia de Buenos Aires. Primera comunicación en la República Argentina. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42(1), 7–12.
- Clavijo, M. J., Hu, D., Krantz, S., Cano, J. P., Pereira Maróstica, T., Henao-Díaz, A., Poeta Silva, A. P. S., Hemker, D., Tapia, E., Zimmerman, S., Fano, E., Polson, D., Fitzgerald, R., Tucker, A., Main, R., Wang, C., Zimmerman, J. J., & Rotolo, M. L. (2021). *Mycoplasma hyopneumoniae* Surveillance in Pig Populations: Establishing Sampling Guidelines for Detection in Growing Pigs. *Journal of Clinical Microbiology*, 59(5), e03051-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.03051-20>
- Deeney, A. S., Collins, R., & Ridley, A. M. (2021). Identification of *Mycoplasma* species and related organisms from ruminants in England and Wales during 2005–2019. *BMC Veterinary Research*, 17, 325. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-03037-y>
- Dhondt, A. A., Dhondt, K. V., Hawley, D. M., & Jennelle, C. S. (2007). Experimental evidence for transmission of *Mycoplasma gallisepticum* in house finches by fomites. *Avian Pathology*, 36(3), 205–208. <https://doi.org/10.1080/03079450701286277>
- Díaz F, A., Labarca L, J., Pérez C, C., Ruiz C, M., & Wolff R, M. (2005). Treatment of community-acquired pneumonia in adults. *Revista chilena de infectología*, 22, s52–s66. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182005000400008>
- Dudek, K., Nicholas, R. A. J., Szacawa, E., & Bednarek, D. (2020). *Mycoplasma bovis* Infections—Occurrence, Diagnosis and Control. *Pathogens*, 9(8), 640. <https://doi.org/10.3390/pathogens9080640>
- Dudek, K., Szacawa, E., & Nicholas, R. A. J. (2021). Recent Developments in Vaccines for Bovine Mycoplasmoses Caused by *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *Mycoides*. *Vaccines*, 9(6), 549. <https://doi.org/10.3390/vaccines9060549>
- Felder, K. M., Hoelzle, K., Ritzmann, M., Kilchling, T., Schiele, D., Heinritzi, K., Groebel, K., & Hoelzle, L. E. (2011). Hemotrophic Mycoplasmas Induce Programmed Cell Death in Red Blood Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 27(5), 557–564. <https://doi.org/10.1159/000329957>
- Ferreira, M. M., Mechler-Dreibi, M. L., Sonalio, K., Almeida, H. M. de S., Ferraz, M. E. S., Jacintho, A. P. P., Maes, D., & de Oliveira, L. G. (2021). Co-infections by *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis* and *Mycoplasma flocculare* in macroscopic lesions of lung consolidation of pigs at slaughter. *Veterinary Microbiology*, 258, 109123. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109123>

- Foster, A. P., Naylor, R. D., Howie, N. M., Nicholas, R. A. J., & Ayling, R. D. (2009). Mycoplasma bovis and otitis in dairy calves in the United Kingdom. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 179(3), 455–457. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.10.020>
- Fox, L. K. (2012). Mycoplasma Mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 28(2), 225–237. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.007>
- Fritschi, J., Marti, H., Seth-Smith, H. M. B., Aeby, S., Greub, G., Meli, M. L., Hofmann-Lehmann, R., Mühlendorfer, K., Stokar-Regenscheit, N., Wiederkehr, D., Pilo, P., Van Den Broek, P. R., & Borel, N. (2020). Prevalence and phylogeny of Chlamydiae and hemotropic mycoplasma species in captive and free-living bats. *BMC Microbiology*, 20, 182. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01872-x>
- García-Galán, A., Gómez-Martín, Á., Bataller, E., Gomis, J., Sánchez, A., Gadea, J., Vieira, L. A., García-Roselló, E., & De la Fe, C. (2020). The Addition of Lactobacillus spp., Enrofloxacin or Doxycycline Negatively Affects the Viability of Mycoplasma bovis in Diluted Bovine Semen. *Animals: an Open Access Journal from MDPI*, 10(5), 837. <https://doi.org/10.3390/ani10050837>
- Gautier-Bouchardon, A. V. (2018). Antimicrobial Resistance in Mycoplasma spp. *Microbiology Spectrum*, 6(4), 6.4.07. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0030-2018>
- Gelgie, A. E., Korsá, M. G., & Kerro Dego, O. (2022). Mycoplasma bovis Mastitis. *Current Research in Microbial Sciences*, 3, 100123. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100123>
- Gille, L., Evrard, J., Callens, J., Supré, K., Grégoire, F., Boyen, F., Haesebrouck, F., Deprez, P., & Pardon, B. (2020). The presence of Mycoplasma bovis in colostrum. *Veterinary Research*, 51, 54. <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00778-w>
- Gioia, G., Addis, M. F., Santisteban, C., Gross, B., Nydam, D. V., Sipka, A. S., Virkler, P. D., Watters, R. D., Wieland, M., Zurakowski, M. J., & Moroni, P. (2021). Mycoplasma species isolated from bovine milk collected from US dairy herds between 2016 and 2019. *Journal of Dairy Science*, 104(4), 4813–4821. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19171>
- Gonzalo de Liria, C. R., & Hernández, M. M. (2013). Infecciones causadas por Mycoplasma pneumoniae. *Anales de Pediatría Continuada*, 11(1), 23–29. [https://doi.org/10.1016/S1696-2818\(13\)70114-8](https://doi.org/10.1016/S1696-2818(13)70114-8)
- Guo, Y., Zhu, H., Wang, J., Huang, J., Khan, F. A., Zhang, J., Guo, A., & Chen, X. (2017). TrmFO, a Fibronectin-Binding Adhesin of Mycoplasma bovis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8), 1732. <https://doi.org/10.3390/ijms18081732>
- Haaheim, H., Vorland, L., & Gutteberg, T. J. (2001). Laboratory diagnosis of respiratory diseases: PCR versus serology. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 20(4–7), 1255–1258. <https://doi.org/10.1081/NCN-100002530>

- Hananeh, W. M., Momani, W. M. A., Ababneh, M. M., & Abutarbush, S. M. (2018). Mycoplasma bovis arthritis and pneumonia in calves in Jordan: An emerging disease. *Veterinary World*, *11*(12), 1663–1668. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.1663-1668>
- Hao, F., Xie, X., Feng, Z., Chen, R., Wei, Y., Liu, J., Xiong, Q., Shao, G., & Lin, J. (2022). NADH oxidase of Mycoplasma hyopneumoniae functions as a potential mediator of virulence. *BMC Veterinary Research*, *18*, 126. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03230-7>
- Harwick, H. J., Kalmanson, G. M., & Guze, L. B. (1972). Human Diseases Associated with Mycoplasmas—With an Appendix on Simple Culture Techniques. *California Medicine*, *116*(5), 1–7.
- Hotzel, H., Frey, J., Bashiruddin, J., & Sachse, K. (2003). Detection and Differentiation of Ruminant Mycoplasmas. En K. Sachse & J. Frey (Eds.), *PCR Detection of Microbial Pathogens* (pp. 231–245). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-344-5:231>
- Hund. (2015). *Microbiología e inmunología en línea: Citando este libro*. <https://www.microbiologybook.org/book/cite.htm>
- Ikeda, p., Seki, m. c., Carrasco, a. o. t., Rudiak, l. v., Miranda, j. m. d., Gonçalves, s. m. m., Hoppe, e. g. l., Albuquerque, a. c. a., Teixeira, m. m. g., Passos, c. e., Werther, k., Machado, r. z., & André, m. r. (2017). Evidence and molecular characterization of Bartonella spp. And hemoplasmas in neotropical bats in Brazil. *Epidemiology and Infection*, *145*(10), 2038–2052. <https://doi.org/10.1017/S0950268817000966>
- Josi, C., Bürki, S., Stojiljkovic, A., Wellnitz, O., Stoffel, M. H., & Pilo, P. (2018). Bovine Epithelial in vitro Infection Models for Mycoplasma bovis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *8*, 329. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00329>
- Kaewmongkol, S., Lakhana, N., Sirinarumit, T., Fenwick, S. G., & Kaewmongkol, G. (2020). Investigation of hemotropic Mycoplasma spp. Genotypes in client-owned cats in Thailand. *Veterinary Microbiology*, *247*, 108765. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108765>
- Kanda, T., Tanaka, S., Suwanruengsri, M., Sukmawinata, E., Uemura, R., Yamaguchi, R., & Sueyoshi, M. (2019). Bovine Endocarditis Associated with Mycoplasma bovis. *Journal of Comparative Pathology*, *171*, 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2019.07.003>
- Lang, F., Lang, K. S., Lang, P. A., Huber, S. M., & Wieder, T. (2006). Mechanisms and Significance of Eryptosis. *Antioxidants & Redox Signaling*, *8*(7–8), 1183–1192. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.1183>
- Levy, J. K., Lappin, M. R., Glaser, A. L., Birkenheuer, A. J., Anderson, T. C., & Edinboro, C. H. (2011). Prevalence of infectious diseases in cats and dogs rescued following

- Hurricane Katrina. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 238(3), 311–317. <https://doi.org/10.2460/javma.238.3.311>
- Maes, D., Boyen, F., Devriendt, B., Kuhnert, P., Summerfield, A., & Haesebrouck, F. (2021). Perspectives for improvement of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccines in pigs. *Veterinary Research*, 52, 67. <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00941-x>
- Malmberg, J. L., O'Toole, D., Creekmore, T., Peckham, E., Killion, H., Vance, M., Ashley, R., Johnson, M., Anderson, C., Vasquez, M., Sandidge, D., Mildenerger, J., Hull, N., Bradway, D., Cornish, T., Register, K. B., & Sondgeroth, K. S. (2020). *Mycoplasma bovis* Infections in Free-Ranging Pronghorn, Wyoming, USA. *Emerging Infectious Diseases*, 26(12), 2807–2814. <https://doi.org/10.3201/eid2612.191375>
- Manzi, M. P., Joaquim, S. F., Guimarães, F. F., Bruder-Nascimento, A. C. M. O., Pantoja, J. C. F., & Langoni, H. (2018). Prevalência de *Mycoplasma bovis* em rebanhos de vacas leiteiras. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 38, 665–669. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5192>
- Maunsell, F. p., Woolums, A. r., Francoz, D., Rosenbusch, R. f., Step, D. l., Wilson, D. j., & Janzen, E. d. (2011). *Mycoplasma bovis* Infections in Cattle. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(4), 772–783. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.0750.x>
- Meseguer-Peinado, M. A., Acosta-Boga, B., Matas-Andreu, L., & Codina-Grau, G. (2012). Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Mycoplasma*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(8), 500–504. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.10.020>
- Minion, F. C. (2002). Molecular pathogenesis of mycoplasma animal respiratory pathogens. *Frontiers in Bioscience*, 7(4), d1410-1422. <https://doi.org/10.2741/A849>
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2014). *Microbiologia Medica* (7a ed.). ELSEIVER.
- Nicholas, R. A. J., & Ayling, R. D. (2003). *Mycoplasma bovis*: Disease, diagnosis, and control. *Research in Veterinary Science*, 74(2), 105–112. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(02\)00155-8](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(02)00155-8)
- Peters, I. R., Helps, C. R., McAuliffe, L., Neimark, H., Lappin, M. R., Gruffydd-Jones, T. J., Day, M. J., Hoelzle, L. E., Willi, B., Meli, M., Hofmann-Lehmann, R., & Tasker, S. (2008). RNase P RNA Gene (rnpB) Phylogeny of Hemoplasmas and Other *Mycoplasma* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(5), 1873–1877. <https://doi.org/10.1128/JCM.01859-07>
- Pijoan, C., Mendoza, S., Torremorell, M., & Ruiz, Á. (2006). Transmisión de *Mycoplasma hyopneumoniae* en una granja con separaciones abiertas o sólidas determinada por la prueba de reacción en cadena de la polimerasa. *Veterinaria México*, 37(2), 181–190.

- Prullage, J. B., Williams, R. E., & Gaafar, S. M. (1993). On the transmissibility of *Eperythrozoon suis* by *Stomoxys calcitrans* and *Aedes aegypti*. *Veterinary Parasitology*, *50*(1–2), 125–135. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(93\)90013-D](https://doi.org/10.1016/0304-4017(93)90013-D)
- Ramírez, A. S., Naylor, C. J., Pitcher, D. G., & Bradbury, J. M. (2008). High inter-species and low intra-species variation in 16S–23S rDNA spacer sequences of pathogenic avian mycoplasmas offers potential use as a diagnostic tool. *Veterinary Microbiology*, *128*(3–4), 279–287. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.10.023>
- Ramos, P., Sepulveda-Garcia, P., Alabí, A., Romero, A., Pinto, T., Rojas, A., Bittencourt, P., & Müller, A. (2021). Molecular survey and genetic characterization of ‘Candidatus *Mycoplasma haemolamae*’ in llamas (*Lama glama*) and alpacas (*Vicugna pacos*) from Southern Chile. *Acta Tropica*, *222*, 106046. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106046>
- Register, K. B., Olsen, S. C., Sacco, R. E., Ridpath, J., Falkenberg, S., Briggs, R., Kanipe, C., & Madison, R. (2018). Relative virulence in bison and cattle of bison-associated genotypes of *Mycoplasma bovis*. *Veterinary Microbiology*, *222*, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.06.020>
- Rodríguez-Mirabal, E., Roblejo-Arias, L., Fonseca-Rodríguez, O., Vega-Cañizares, E., Lobo-Rivero, E., Rodríguez-Mirabal, E., Roblejo-Arias, L., Fonseca-Rodríguez, O., Vega-Cañizares, E., & Lobo-Rivero, E. (2021). Ocurrencia de estructuras compatibles con hemoplasmas en caninos no domiciliados de Cuba. *Revista de Salud Animal*, *43*(1). [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0253-570X2021000100004&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0253-570X2021000100004&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Rottem, S. (2003). Interaction of *Mycoplasmas* With Host Cells. *Physiological Reviews*, *83*(2), 417–432. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2002>
- Rufo, D. G., Sánchez, E. G., Sánchez, J. E. G., & Moro, M. G. (2021). Implicaciones clínicas de las especies del género *Mycoplasma*. *Revista Española de Quimioterapia*, *34*(3), 169–184. <https://doi.org/10.37201/req/014.2021>
- Sawicka-Durkalec, A., Kurska, O., Bednarz, Ł., & Tomczyk, G. (2021). Occurrence of *Mycoplasma* spp. in wild birds: Phylogenetic analysis and potential factors affecting distribution. *Scientific Reports*, *11*, 17065. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96577-0>
- Sickles, S. A., Kruze, J., & Gonzalez, R. N. (2000). Aislamiento de *Mycoplasma bovis* en muestras de leche de estanque en rebaños lecheros del sur de Chile. *Archivos de medicina veterinaria*, *32*(2), 235–240. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2000000200011>
- Sonalio, K., Perles, L., Gatto, I. R. H., do Amaral, R. B., Almeida, H. M. S., Galdeano, J. V. B., Vieira, R. F. C., André, M. R., & de Oliveira, L. G. (2021). Genetic diversity of emerging hemotropic mycoplasmas in domestic pigs from Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*, *68*(3), 1162–1174. <https://doi.org/10.1111/tbed.13767>

- Sosa, C., Tirante, L., Chaves, J., Pol, M., Ambrogi, A., Giraudo, J. A., & Tamiozzo, P. (2018). Identificación de especies de *Mycoplasma* y de *Ureaplasma diversum* en rodeos lecheros de Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, *50*(1), 31–35. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.02.010>
- Stadler, J., Willi, S., Ritzmann, M., Eddicks, M., Ade, J., Hoelzle, K., & Hoelzle, L. E. (2019). Detection of *Mycoplasma suis* in pre-suckling piglets indicates a vertical transmission. *BMC Veterinary Research*, *15*, 252. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2001-y>
- Sulyok, K. M., Bekő, K., Kreizinger, Z., Wehmann, E., Jerzsele, Á., Rónai, Z., Turcsányi, I., Makrai, L., Szeredi, L., Jánosi, S., Nagy, S. Á., & Gyuranecz, M. (2018). Development of molecular methods for the rapid detection of antibiotic susceptibility of *Mycoplasma bovis*. *Veterinary Microbiology*, *213*, 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.11.026>
- Tardy, F., Aspan, A., Autio, T., Ridley, A., Tricot, A., Colin, A., Pohjanvirta, T., Smid, B., Harders, F., Lindegaard, M., Tølbøll Lauritsen, K., Lyhs, U., Wisselink, H. J., & Strube, M. L. (2020). *Mycoplasma bovis* in Nordic European Countries: Emergence and Dominance of a New Clone. *Pathogens*, *9*(11), 875. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110875>
- Taylor-Robinson, D., & Bébéar, C. (1997). Antibiotic susceptibilities of mycoplasmas and treatment of mycoplasmal infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *40*(5), 622–630. <https://doi.org/10.1093/jac/40.5.622>
- 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. *The Veterinary Journal*, *168*(1), 100–102. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2003.10.006>
- Timonen, A. A. E., Autio, T., Pohjanvirta, T., Häkkinen, L., Katholm, J., Petersen, A., Mõtus, K., & Kalmus, P. (2020). Dynamics of the within-herd prevalence of *Mycoplasma bovis* intramammary infection in endemically infected dairy herds. *Veterinary Microbiology*, *242*, 108608. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108608>
- Vega-Orellana, O., Poveda, J. B., Rosales, R. S., Bradbury, J. M., Poveda, C. G., Mederos-Iriarte, L. E., Tavío, M. M., & Ramírez, A. S. (2017). Comparison of different NAT assays for the detection of microorganisms belonging to the class Mollicutes. *BMC Veterinary Research*, *13*, 195. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1116-2>
- Westmoreland, L. S. H., Stoskopf, M. K., & Maggi, R. G. (2017). Detection and prevalence of four different hemotropic *Mycoplasma* spp. in Eastern North Carolina American black bears (*Ursus americanus*). *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, *50*, 106–109. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.12.002>

- Yuan, C. L., Liang, A. B., Yao, C. B., Yang, Z. B., Zhu, J. G., Cui, L., Yu, F., Zhu, N. Y., Yang, X. W., & Hua, X. G. (2009). Prevalence of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) infection in swine and swine-farm workers in Shanghai, China. *American Journal of Veterinary Research*, 70(7), 890–894. <https://doi.org/10.2460/ajvr.70.7.890>
- Zhang, L., Zong, Z.-Y., Liu, Y.-B., Ye, H., & Lv, X.-J. (2011). PCR versus serology for diagnosing *Mycoplasma pneumoniae* infection: A systematic review & meta-analysis. *The Indian Journal of Medical Research*, 134(3), 270–280.

## Artículo I

### Especies de *Mycoplasma* en animales domésticos y silvestres de Costa Rica: un estudio transversal (2023).

#### Resumen

*Mycoplasma* es una bacteria de tamaño reducido, pleomórfica que carece de pared celular. En la actualidad se han identificado más de 100 especies a nivel mundial, colonizando humanos, mamíferos, peces, reptiles, artrópodos y plantas. El objetivo del presente estudio fue identificar la presencia de especies de *Mycoplasma* en mucosas y eritrocitos de animales silvestres y domésticos de Costa Rica. Mediante un estudio transversal descriptivo se analizaron un total de 529 muestras de ADN de sangre, semen, hisopados bucotraqueales de animales silvestres y domésticos, recolectados entre enero y septiembre del 2023 (n=75) o provenientes de bancos de ADN (n=454) mediante cinco técnicas moleculares (reacción en cadena de la polimerasa [PCR]) para la detección del gen ARNr 16S de la clase *Mollicutes* y de *Mycoplasma canadense*, del gen *rpo β* de *Mycoplasma californicum* y de *Mycoplasma bovis genitalium*, y del gen *uvrC* de *Mycoplasma bovis* y secuenciación. Un total de 11,2% (59/529) muestras resultaron positivas en el PCR que amplificó el gen ARNr 16S de la clase *Mollicutes*. Los resultados de secuenciación identificaron siete especies de *Mycoplasma*; *Mycoplasma salivarium* en 22,2% (6/27) de primates no humanos, *Mycoplasma hyorhinis* en 84,6% (11/13) de cerdos, “*Ca. Mycoplasma turisencis*” en 3,1% (5/161) de gatos domésticos y *Mycoplasma haemocanis* en 9,0% (1/11) de mapaches. Además, se estableció la presencia de especies de *Mycoplasma* en un 30,0% (21/70) de muestras de semen bovino; *M. canadense* en 33,3% (7/21), *M. californicum* en 19,0% (4/21), y *M. bovis genitalium* en 47,6% (10/21) muestras, dos bovinos mostraron infección mixta de *M. bovis genitalium* - *M. canadense* y un bovino de *M. californicum* - *M. bovis genitalium*. El presente estudio estableció por primera vez la presencia de siete especies de *Mycoplasma* en animales silvestres y domésticos de Costa Rica y Centroamérica. Se recomienda estudiar su impacto sobre la salud de los animales infectados.

#### Palabras claves

Reacción en Cadena de la Polimerasa, biología molecular, secuenciación, bacteriología, trópico, *Mycoplasma* spp.

## Abstract

*Mycoplasma* is a small, pleomorphic bacterium that lacks a cell wall. Over 100 species have been identified worldwide, colonizing humans, mammals, fish, reptiles, arthropods, and plants. This study aimed to determine the presence of *Mycoplasma* species in mucous membranes and erythrocytes of wild and domestic animals in Costa Rica. Through a descriptive cross-sectional study, a total of 529 DNA samples from blood, semen, and orotracheal swabs of wild and domestic animals, collected between January and September 2023 (n=75) or from DNA banks (n=454), were analyzed using five molecular techniques (polymerase chain reaction [PCR]) for the detection of the 16S rRNA gene of the *Mollicutes* class and *Mycoplasma canadense*, the *rpo*  $\beta$  gene of *Mycoplasma californicum* and *Mycoplasma bovis genitalium*, and the *uvrC* gene of *Mycoplasma bovis* and sequencing. A total of 11.2% (59/529) of the samples were positive in the PCR that amplified the 16S rRNA gene of the *Mollicutes* class. The sequencing results identified seven *Mycoplasma* species: *Mycoplasma salivarium* in 22.2% (6/27) of non-human primates, *Mycoplasma hyorhinis* in 84.6% (11/13) of pigs, “*Candidatus Mycoplasma turisencis*” in 3.1% (5/161) of domestic cats, and *Mycoplasma haemocanis* in 9.0% (1/11) of raccoons. In addition, the presence of *Mycoplasma* species was established in 30.0% (21/70) of bovine semen samples; *M. canadense* in 33.3% (7/21), *M. californicum* in 19.0% (4/21), and *M. bovis genitalium* in 47.6% (10/21) samples, two bovines showed mixed infection of *M. bovis genitalium* - *M. canadense* and one bovine of *M. californicum* - *M. bovis genitalium*. The present study established for the first time seven species of *Mycoplasma* in wild and domestic animals of Costa Rica and Central America. It is recommended that their impact on the health of infected animals be studied.

## Keywords

Polymerase Chain Reaction, molecular biology, sequencing, bacteriology, tropics, *Mycoplasma* spp.

## 1. Introducción

El género *Mycoplasma* pertenece al filo *Firmicutes*, clase *Mollicutes*, orden *Mycoplasmatales*, y familia *Mycoplasmataceae* (Gautier-Bouchardon, 2018). Mediante análisis moleculares del gen ARNr 16S se logró demostrar que se derivan de bacterias Gram positivas (Sirand-Pugnet et al., 2007). Es la bacteria más pequeña, con un genoma de 0,6 a 1,35 Mb (Arfi et al., 2021), pleomórfica, que carece de pared celular (Dudek et al., 2021). Debido a su limitada capacidad metabólica suele comportarse como un parásito obligado para producir los metabolitos necesarios para su supervivencia (Arfi et al., 2021). Este grupo de bacterias contiene una cantidad mínima de organelas para el crecimiento y replicación (solamente membrana plasmática y ribosomas), algo que hace que su cultivo en el laboratorio sea difícil debido a su complejo requerimiento nutricional (Gautier-Bouchardon, 2018).

En la actualidad se han logrado identificar más de 100 especies del género *Mycoplasma* (Sawicka-Durkalec et al., 2021), ampliamente distribuidas a nivel mundial, las cuales se presentan en la naturaleza como comensales o patógenos oportunistas. Las micoplasmas se encuentran presentes en humanos, mamíferos, reptiles, peces, artrópodos y plantas, algunas especies se consideran con potencial zoonótico. De acuerdo con sus características biológicas y filogenéticas se dividen en dos grupos: micoplasmas de las mucosas y hemoplasmas, por su tropismo por las mucosas y glóbulos rojos, respectivamente (Rodríguez-Mirabal et al., 2021). El grupo de micoplasmas de las mucosas ocasionan cuadros clínicos y pérdidas económicas en granjas de producción (Deeney et al., 2021), mientras que las hemoplasmas infectan glóbulos rojos de animales domésticos, silvestres e incluso humanos sin graves consecuencias (Peters et al., 2008; Correia dos Santos et al., 2020).

El diagnóstico de las micoplasmas se basa en el cultivo bacteriológico (estándar de oro), sin embargo, es de alta complejidad, caro, lento y poco sensible (Matas Andreu et al., 2006). El diagnóstico de hemoplasmas mediante frotis de sangre periférica se torna difícil porque debe de ser realizado por un experto (Congli et al., 2011). Debido a su alta sensibilidad y especificidad, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sustituido las técnicas de cultivo y frotis sanguíneo (Sawicka et al., 2020). El tratamiento de elección para las especies de *Mycoplasma* son todos aquellos antibióticos que inhiben la síntesis proteica y de ácidos nucleicos como tetraciclinas, fluoroquinolonas, aminoglucósidos, anfencoles, macrólidos y lincosamidas, no se recomienda el uso de  $\beta$ -lactámicos, esto

debido a la carencia de pared celular, los que los hace intrínsecamente resistentes a esta familia de antibióticos (Klein et al., 2022).

Los reportes sobre la presencia de micoplasmas en América son escasos. Hasta la fecha se ha reportado ADN de *Mycoplasma* spp. en sangre de perros (11,9%, 40/345) y gatos (10,6%, 5/47) en los Estados Unidos (Levy et al., 2011, Marcondes et al., 2018); en Brasil se ha encontrado un 8,9% (8/90) de *Mycoplasma* spp. en médula ósea de gatos (Marcondes et al., 2018). Además, se ha detectado *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Mycoplasma hyorhinis* como agentes causales de la neumonía enzoótica en granjas porcinas de Brasil, México y Argentina (Dos Santos et al., 2015; Moiso et al., 2020). Finalmente se ha establecido la presencia de siete especies de *Mycoplasma* ocasionando enfermedades respiratorias, mastitis, artritis e infertilidad en bovinos de Argentina (Cantón et al., 2022, Tamiozo et., al 2014).

En animales silvestres se ha encontrado hasta la fecha la presencia de *Mycoplasma haemocanis* en 56,6%, (47/80) de muestras sanguíneas de zorros de Darwin (*Lycalopex fulvipes*) (Di Cataldo et al., 2020). En un 13% (22/146) de félidos salvajes viviendo en cautiverio en Brasil, se encontró mediante PCR convencional y secuenciación, especies estrechamente relacionadas con “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” y *Mycoplasma haemofelis*, mientras que en cuatro canidos salvajes se determinó la presencia de *Mycoplasma haematoparvum* y “*Ca. M. haemominutum*” (André et al., 2011).

En Costa Rica y la región centroamericana son más escasos aún los estudios sobre micoplasmosis. Solamente en Costa Rica se reporta la presencia de *Mycoplasma* spp. en murciélagos (Fritschí et al., 2020), y de *M. haemominutum* en gatos domésticos (6/36, 15,7%) (Arguedas-Herrera, 2023). El objetivo de la presente investigación fue detectar y caracterizar mediante técnicas moleculares las especies de *Mycoplasma* presentes en mucosas, sangre y semen de animales domésticos y silvestres de Costa Rica.

## **2. Materiales y métodos**

### **2.1 Tipo de estudio y población**

Se realizó un estudio transversal descriptivo, no probabilístico y por conveniencia, para determinar la presencia y diversidad de especies de *Mycoplasma* spp. en mucosas, eritrocitos y semen de animales silvestres y domésticos. Para esto se analizaron hisopados (bucotraqueales, cloacales, conjuntivales) remitidos por hospitales y centros de rescate

durante nueve meses (enero a octubre 2023), así como ADN de muestras de sangre, semen e hisopados recolectados en diversos proyectos de investigación, que se encontraban conservados a -20 °C.

## 2.2 Tamaño y tipo de muestra

Se analizaron un total de 529 muestras, de las cuales 75 fueron remitidas al Laboratorio de Zoonosis y Entomología durante los nueve meses que duró la investigación, y 454 provenían del banco de ADN del laboratorio antes mencionado ubicado en la Escuela de Medicina Veterinaria, Campus Benjamín Núñez, de la Universidad Nacional de Costa Rica. Un total de 305 (57,6%) muestras provenían de animales domésticos y 224 (42,4%) de animales silvestres (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Desglose de las muestras analizadas, por especie animal, tipo de muestra y procedencia.

Especie	Muestras remitidas al laboratorio				Banco ADN				
	Hisopado	Sangre	Semen	Total	Hisopado	Sangre	Semen	Total	n (%)
<b>Felino (<i>Felis catus</i>)</b>	2	7	0	9	0	152	0	152	<b>161 (30,4)</b>
<b>Canino (<i>Canis lupus familiaris</i>)</b>	0	2	0	2	0	59	0	59	<b>61 (11,5)</b>
<b>Bovino (<i>Bos taurus</i>)</b>	0	0	0	0	0	0	70	70	<b>70 (13,2)</b>
<b>Cerdo (<i>Sus scrofa domestica</i>)</b>	13	0	0	13	0	0	0	0	<b>13 (2,5)</b>
<b>Sub Total</b>	<b>15</b>	<b>9</b>	<b>0</b>	<b>24</b>	<b>0</b>	<b>211</b>	<b>70</b>	<b>281</b>	<b>305 (57,6)</b>
<b>Boa (<i>Boa constrictor</i>)</b>	0	1	0	1	0	0	0	0	<b>1 (0,2)</b>
<b>Caimán (<i>Caiman crocodilus</i>)</b>	2	0	0	2	0	0	0	0	<b>2 (0,4)</b>
<b>Danta (<i>Tapirus bairdii</i>)</b>	0	0	0	0	0	1	0	1	<b>1 (0,2)</b>
<b>Jaguar (<i>Panthera onca</i>)</b>	0	1	0	1	0	0	0	0	<b>1 (0,2)</b>
<b>Lechuza (<i>Tyto alba</i>)</b>	0	1	0	1	0	0	0	0	<b>1 (0,2)</b>
<b>Mapache (<i>Procyon lotor</i>)</b>	0	2	0	2	0	9	0	9	<b>11 (2,1)</b>

<b>Mono ardilla</b> ( <i>Saimiri oesrtedii</i> )	0	0	0	0	5	10	0	15	<b>15 (2,8)</b>
<b>Mono aullador</b> ( <i>Alouatta palliata</i> )	0	0	0	0	5	8	0	13	<b>13 (2,5)</b>
<b>Mono araña</b> ( <i>Ateles geoffroyi</i> )	0	0	0	0	3	8	0	11	<b>11(2,1)</b>
<b>Mono cara blanca</b> ( <i>Cebus capucinus</i> )	0	0	0	0	8	25	0	33	<b>33 (6,2)</b>
<b>Mono titi</b> ( <i>Callithix jacchus</i> )	0	0	0	0	6	10	0	16	<b>16(3,1)</b>
<b>Ocelote</b> ( <i>Leopardus pardalis</i> )	0	1	0	1	0	0	0	0	<b>1 (0,2)</b>
<b>Perezoso</b> ( <i>Barypus variegatus</i> )	1	6	0	7	0	0	0	0	<b>7 (1,3)</b>
<b>Rana de vidrio</b> ( <i>Esparadana prosoblepon</i> )	0	0	0	0	6	0	0	6	<b>6 (1,1)</b>
<b>Rana de vidrio</b> ( <i>Hyalinobatrachium fleishmanni</i> )	0	0	0	0	8	0	0	8	<b>8 (1,5)</b>
<b>Rana cafetalera</b> ( <i>Agalichnis annae</i> )	0	0	0	0	1	0	0	1	<b>1 (0,2)</b>
<b>Venado</b> ( <i>Odocoileus virginianus</i> )	0	0	0	0	0	60	0	60	<b>60 (11,3)</b>
<b>Murciélago</b> (Quiroptero)	16	16	0	32	0	0	0	0	<b>32 (6)</b>
<b>Zorra gris</b> ( <i>Lycalopex griseus</i> )	1	1	0	2	0	0	0	0	<b>2 (0,4)</b>
<b>Zarigüeya</b> ( <i>Didelphis marsupialis</i> )	0	2	0	2	0	0	0	0	<b>2 (0,4)</b>
<b>Subtotal</b>	20	31	0	<b>51</b>	42	131	0	<b>173</b>	<b>224 (42,4)</b>
<b>Total</b>									<b>529 (100)</b>

### 2.3 Extracción de ADN de muestras de sangre e hisopados

La extracción de ADN de las muestras de sangre e hisopados remitidas al laboratorio se realizó utilizando el ensayo comercial DNeasy Blood® & Tissue (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante y fueron conservadas a -20°C hasta su análisis. La calidad

y cantidad de ADN en las muestras a analizar se estableció con el equipo NanoDrop® ONE de la casa comercial Thermo Scientific antes de someterlas a PCR.

## **2.4 Detección molecular de especies de *Mycoplasma***

### **2.4.1 PCR convencional para la detección un fragmento del gen ARNr 16S**

Para identificar la presencia de especies de *Mycoplasma* (Clase *Mollicutes*) se amplificó un fragmento del gen ARNr 16S mediante PCR convencional, utilizando los iniciadores GPO-1 F 5'- ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA-3' y MGSO R 5'- TGCACCATCTGTCCTCTGTAAACCTC-3' (Kong et al., 2001; van Kuppeveld et al., 1994). Se preparó una mezcla con volumen final de 12,5 µL, utilizando 6,25 µL de mezcla maestra DreamTaq (1X) de la casa comercial Thermo Scientific™, 1 µL de cada primer, en concentración de 10 uM, 1,75 µL de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas y 2,5 µL de ADN. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador de punto final de la marca ProFlex™ 3 x 32 Well (Applied Biosystem) con las siguientes condiciones de ciclado: desnaturalización inicial de 95 °C por 3 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 30 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 30 s, y una extensión final a 72 °C por 5 min. Los productos amplificados se visualizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%, con buffer TBE, se utilizó buffer de carga 6X con el colorante Gel Red y un marcador de peso molecular de la marca GeneRuler 100pb plus DNA Ladder, de la casa comercial Thermo Scientific, aplicando corriente de 90 voltios durante 55 minutos. Las muestras que presentaron un fragmento aproximadamente de 780 pb se consideraron positivas y se prepararon para su envío para secuenciar.

### **2.4.2 PCR convencional para la determinación de *M. canadense*, *M. californicum* y *M. bovis genitalium* en bovinos**

Para la identificación de especies de *Mycoplasma* en muestras de origen bovino se utilizó un PCR convencional que amplificó un fragmento del gen ARNr 16S de *M. canadense* (470pb), un PCR convencional dirigido al fragmento del gen rpo β de *M. bovis genitalium* (416pb) y un PCR que amplificó el gen rpo β de *M. californicum* (404pb), utilizando los siguientes iniciadores: para *M. canadense*. 16SF 5'ATTCCACAATGAGCGAAAGC-3', 16SR 5'-CCACCGACTAATGATCATCG-3', para *M. bovis genitalium* MbvgRpoBF 5'-CATGGACCAAATCAACCCAC-3' MbvgRpoBR, 5'-GTCAATTCGTCAGCTGAGG-3', y para *M. californicum* McalRpoBF 5'-ACTCGGCACTTAGACGAAAG-3', McalRpoBR 5'-TCAACTGGCGTACCATCTTC-3'. Los iniciadores fueron diseñados en la Escuela de Medicina Veterinaria, con ayuda del Dr. Alberto Alberti, Universidad de

Sassari, Italia. Para la reacción se preparó una mezcla con volumen final de 12,5 µL, utilizando 6,25 µL de mezcla maestra DreamTaq (2X) de la casa comercial Thermo Scientific™, 1 µL de cada primer, en concentración de 10 uM, 1,75 µL de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas y 2,5 µL de ADN. Para la amplificación de ADN de *M. canadense* y *M. californicum* se realizó una desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 s, 56°C por 30 s, 72°C por 45 s y una extensión final a 72°C por 5 min. Para la detección de ADN de *M. bovigentalium* se realizó una desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 s, 53°C por 1 min, 72°C por 45 s y una extensión final a 72°C por 5 min. Los amplicones fueron visualizados en geles de agarosa al 2% en un transiluminador. Las muestras que presentaron un fragmento aproximado de 470pb, 416pb, y 404 pb se consideraron positivas para *M. canadense*, *M. bovigentalium* y *M. californicum*, respectivamente, y se enviaron a secuenciar para confirmación.

#### **2.4.3 PCR en tiempo real para la detección de *M. bovis***

Para detectar *M. bovis* en muestras bovinas, se utilizó un PCR en tiempo real (qPCR), utilizando los iniciadores 5'-AAGTTGAAGTTGACCGGTTTG-3' y 5'-TCCATATTTGGACCTAGTCCTTT-3', que amplifican un segmento de 106 pb del gen de reparación *uvrC* (Thomas, 2004). Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador QuantStudio 3 de Applied Biosystems, usando el protocolo de Behera et al. (2018) con algunas modificaciones: se usó 0,5 µL de cada primer, en concentración de 10 uM, 1 µL de ADN, 5,2 µL del super mix SoFast EvaGreen con Low ROX, de la casa comercial Bio Rad, 2,8 µL de agua libre de nucleasas, para un volumen final de reacción de 10 µL. Las condiciones de ciclados consistieron en una desnaturalización inicial de 95 °C durante 1 minuto, seguidos de 40 ciclos de 95 °C durante 1 minuto, 60 °C durante 10s, y finalmente un estado de disociación de 55–95 °C.

#### **2.4.4 Secuenciación**

Muestras seleccionadas, que resultaron positivas en los PCR convencionales, se enviaron a MacroGen en Seoul, Corea del Sur para realizar secuenciación utilizando el método de Sanger. Las secuencias obtenidas fueron alineadas y editadas con el programa BioEdit y se compararon con las secuencias disponibles en la base de datos de GenBank mediante la utilización del programa BLAST (Basic Local Aligment Search Tool) de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

### 3. Resultados

De las 529 muestras analizadas, 59 (11,2%) resultaron positivas en el PCR de ARNr 16S, 6/27 (22,2%) muestras bucotraqueales de monos, 4 cariblanco (*Cebus capucinus*), 1 mono ardilla (*Saimiri oesrteidii*) y 1 mono araña (*Ateles geoffroyi*), 11/13 (84,6%) hisopados de cerdos, 5/161 (3,1%) muestras sanguíneas de gatos, y 1/11 (9,0%) muestra sanguínea de mapache, de las cuales se enviaron a secuenciar 23, pudiéndose establecer la especie de *Mycoplasma* presente en un 82,6% (19/23) de los casos. Se determinó la presencia de *Mycoplasma salivarium* en muestras de monos, *M. hyorhinis* en hisopados de cerdos, “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” y *M. haemocanis* en sangre de gatos y de mapache, respectivamente (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Secuencias de los productos amplificados con el PCR del fragmento del gen ARNr 16S de la clase *Mollicutes*, a partir de muestras de animales domésticos y silvestres.

<b>Muestra</b>	<b>Cepa patrón (Código GenBank)</b>	<b>Similitud nucleotídica (pb)</b>
Gato 1 ( <i>Felis catus</i> )	<b>100% (242/242)</b>	<i>Ca. M. turicensis</i> (KR905459)
Gato 2 ( <i>Felis catus</i> )	<b>99,6% (255/256)</b>	<i>Ca. M. turicensis</i> (MN543638)
Gato 3 ( <i>Felis catus</i> )	<b>100% (242/242)</b>	<i>Ca. M. turicensis</i> (KR905458)
Gato 4 ( <i>Felis catus</i> )	<b>99% (200/202)</b>	<i>Ca. M. turicensis</i> (KR905459)
Gato 5 ( <i>Felis catus</i> )	<b>99,1% (233/235)</b>	<i>Ca. M. turicensis</i> (KM275258)
Cerdo 1 ( <i>Sus scrofa domestica</i> )	<b>99,5% (236/237)</b>	<i>M. hyorhinis</i> (CP035041)
Cerdo 2 ( <i>Sus scrofa domestica</i> )	<b>99,6% (248/249)</b>	<i>M. hyorhinis</i> (LS991950)

Cerdo 3 ( <i>Sus scrofa domestica</i> )	<b>99,6% (309/310)</b>	<i>M. hyorhinis</i> (CP006849)
Mono ardilla ( <i>Saimiri oesrteidii</i> )	<b>99,6% (246/247)</b>	<i>M. salivarium</i> (LR214939)
Mono araña ( <i>Ateles geoffroyi</i> )	<b>99,1% (237/239)</b>	<i>M. salivarium</i> (LR214939)
Mono cara blanca 1 ( <i>Cebus capucinus</i> )	<b>100% (231/231)</b>	<i>M. salivarium</i> (MG932670)
Mono cara blanca 2 ( <i>Cebus capucinus</i> )	<b>100% (228/228)</b>	<i>M. salivarium</i> (OR053665)
Mono cara blanca 3 ( <i>Cebus capucinus</i> )	<b>99,5% (239/240)</b>	<i>M. salivarium</i> (LR214939)
Mono cara blanca 4 ( <i>Cebus capucinus</i> )	<b>100% (239/239)</b>	<i>M. salivarium</i> (LR214939)
Mapache ( <i>Procyon lotor</i> )	<b>99% (542/547)</b>	<i>M. haemocanis</i> (MN294708)

---

El análisis de las muestras de semen de bovinos con el PCR, que amplifica un fragmento del gen ARNr 16S de la clase *Mollicutes* detectó 37/70 (52,8%) muestras como positivas, la secuenciación de un total de 16 muestras identificó una como *Ureaplasma diversum*, mostrando una identidad nucleotídica de 97,6% (565pb/579pb) con la secuencia JN935894.1 depositada en GenBank, mientras que las restantes 15 no se lograron asociar con ningún agente infeccioso.

Debido a estos resultados se estandarizaron PCR específicas para detectar especies de *Mycoplasma*, determinándose un total de 21/37 (56,7%) muestras positivas a tres especies de *Mycoplasma* bovinos, de las cuales tres fueron confirmadas mediante secuenciación (Cuadro 3). La presencia de *M. bovis genitalium* se encontró en 10/21 (47,6%), *M. canadense* en 7/21 (33,3%), y *M. californicum* en 4/21 (19,0%) de las muestras. En un toro se encontró infección mixta *M. californicum* – *M. bovis genitalium* y en dos animales coinfección de *M. canadense* - *M. bovis genitalium*. No se determinó la presencia de *M. bovis*.

**Cuadro 3.** Especies de *Mycoplasma* determinadas en semen de bovinos mediante el uso de PCR específicos para *M. californicum*, *M. bovis genitalium*, *M. canadense*.

Especie	Tipo muestra	PCR	Total de positivos	Cepa patrón (Código GenBank)	Similitud nucleotídica (pb)
Bovino 10 ( <i>Bos taurus</i> )	Semen	PCR ARNr 16S <i>M. californicum</i>	4/37	<b>99,8%</b> <b>(402/403)</b>	<i>M. californicum</i> (AP018944)
Bovino 67 ( <i>Bos taurus</i> )	Semen	PCR gen rpo $\beta$ <i>M. canadense</i>	7/37	<b>99,8%</b> <b>(461/462)</b>	<i>M. canadense</i> (LC158835.1)
Bovino 5 ( <i>Bos taurus</i> )	Semen	PCR gen rpo $\beta$ <i>M. bovis genitalium</i>	10/37	<b>99,5%</b> <b>(466/468)</b>	<i>M. bovis genitalium</i> (AY121096)

#### 4. Discusión

El presente estudio reporta por primera vez la presencia de siete especies de *Mycoplasma* en animales silvestres y domésticos de Costa Rica y Centroamérica. En el grupo de animales domésticos se encontraron un 17,4% (53/305) de muestras positivas, el porcentaje de positividad reportado para hemoplasmas en gatos domésticos (3,1%) fue mucho menor que el reportado en los Estados Unidos (10,6%) (Levy et al., 2011, Marcondes et al., 2018) y en Brasil (8,9%) (Marcondes et al., 2018). En el 2023 Arguedas y colaboradores (2023) reportaron la presencia de “*Ca. M. haemominutum*” en gatos de Costa Rica, una especie diferente a la encontrada en la presente investigación. La especie de micoplasmas encontradas en gatos es hemotrópica, transmitidas principalmente por vectores biológicos como pulgas y garrapatas (Levy et al., 2011). Gatos adultos, sin raza definida, infestados con pulgas y garrapatas e infectados con el virus de la inmunodeficiencia felina son los que generalmente se encuentran infectados (Rosenqvist et al., 2016; Duarte et al., 2015).

Además, se reporta por primera vez el hallazgo de *M. hyorhinis* en cerdos con enfermedad respiratoria en Costa Rica (Lin et al., 2006). Este agente ha sido reportado como agente causal de la neumonía enzoótica porcina, además puede ocasionar poliseritis, artritis, y meningitis (Clavijo et al., 2017; Bünger et al., 2020). En México se ha reportado un alto porcentaje de positividad (51,8%) (Miranda Morales et al., 2020), comparado con países europeos como Alemania y Suiza (18,5% y 10,0%, respectivamente) (Luehrs et al., 2017).

En estudios futuros se recomienda determinar la prevalencia de *M. hyorhinis* y la afectación en las piaras de Costa Rica, como también identificar la circulación de otras especies de micoplasma asociadas con enfermedades en porcinos como *M. hyopneumoniae* o *Mycoplasma suis* (hemoplasma).

En un 30,0% (21/70) de muestras de semen proveniente de toros utilizados como padrotes en hatos de carne se detectó por primera vez en Costa Rica y Centroamérica la presencia de *M. californicum*, *M. canadense* y *M. bovis genitalium*. *Mycoplasma canadense* y *M. californicum* han sido reportados presentes en EEUU (Gioia et al., 2021), en México (Infante-Martínez et al., 1999), y en Argentina (Tamiozzo et al., 2014) ocasionando mastitis, mientras que *M. bovis genitalium* tiene una mayor distribución en regiones de EEUU, África del Norte y Europa, ocasionando enfermedades respiratorias, artritis, neumonía, y mastitis en bovinos. En América Latina solo se había reportado hasta la fecha en Argentina (Sosa et al., 2018).

Estos micoplasmas ocasionan en bovinos machos infección del tracto urinario, ocasionando eventualmente una infección testicular que se podría manifestar con orquitis e infertilidad (Nicholas & Ayling, 2003). Como estas bacterias son de difícil diagnóstico y aislamiento, pueden pasar desapercibidas en hatos ganaderos y convertirse en agentes infecciosos desatendidos, por lo que se debe descartar la presencia de éstos al inseminar vacas o cruzarlas con un macho infectado (Hata et al., 2017). En tres (8,1%) de los 37 bovinos se encontraron coinfecciones, que no han sido reportadas anteriormente en otros estudios.

En la presente investigación, se utilizó inicialmente la amplificación del fragmento del gen ARNr 16S para la clase *Mollicutes* identificando además de *Mycoplasma*, ureaplasmas, sin embargo, se diseñaron y estandarizaron PCRs convencionales especie específica para las micoplasmas bovinas, esto con el fin de aumentar la sensibilidad en la identificación de las especies causales de enfermedades en bovinos, los cuales resultaron específicas y se recomiendan utilizar. En la presente investigación se detectó *U. diversum* en semen de un bovino, lo cual se ha reportado como causal de infertilidad, pérdida de peso y disminución de la calidad de leche en bovinos en Brasil, USA y Argentina, ocasionando importantes pérdidas económicas, por lo que se recomienda estudiar este agente en futuras investigaciones (Santos Junior et al., 2021, Sosa et al., 2018).

En seis (22,2%) de 27 hisopados bucales de monos de tres especies (mono cariblanco, mono tití y mono ardilla) se encontró la presencia de *M. salivarium*, una especie de bacteria causal de gingivitis en humanos y primates no humanos (David Engel & Kenny, 1970), aunque también se ha reportado en líquido sinovial de pacientes con artritis (Johnson et al., 2007). Los primates positivos eran animales que se encontraban en cautiverio en cuatro centros de rescate diferentes (Manuel Antonio, Cañas, Barra del Colorado y Alajuela), indicando una amplia distribución del agente en el país. Este es el primer reporte de esta especie de *Mycoplasma* en la cavidad oral de primates no humanos del Nuevo Mundo y concuerda con la especie reportada en Japón por Koshimizu y colaboradores (1975).

En uno (9,1%) de 11 mapaches (*Procyon lotor*) que residían en el Parque Nacional Manuel Antonio y alrededores se logró identificar la presencia de *M. haemocanis*, lo que coincide con reportes en EEUU (Volokhov et al., 2017), y en Brasil, en mapaches cangrejeros (*Procyon cancrivorus*) (Fagundes-Moreira et al., 2023). Esta especie de *Mycoplasma* es causal de anemias que pueden ser de leves a crónicas en canidos, félidos y especies de vida silvestre, y es el primer reporte en mapaches de Costa Rica. Este hallazgo es de gran importancia, debido a que estos animales se logran adaptar con gran facilidad a entornos urbanos, y pueden pasar los patógenos a otros animales (como caninos) o al ser humano o viceversa (Bradley & Altizer, 2007; Volokhov et al., 2017). Se recomienda continuar con una búsqueda activa y mantener un constante monitoreo de micoplasmas en las poblaciones domésticas y silvestres de Costa Rica, para evitar el paso de patógenos entre estos grupos de animales, y evitar así la aparición de enfermedades emergentes (Dacak et al., 2021).

## 5. Conclusiones

- Se reporta por primera vez en Costa Rica y Centroamérica la presencia de siete especies de *Mycoplasma* en mucosa y sangre de animales silvestres y domésticos.
- Se reporta por primera vez la presencia de *M. salivarium*, agente causal de la gingivitis en primates no humanos (mono cariblanco, mono tití y mono ardilla) de Costa Rica.
- Se reporta por primera vez la presencia de *M. hyorihinis*, agente causal de la neumonía enzoótica en piaras de cerdos de Costa Rica.
- Se reporta por primera vez la presencia de *Ca. M. turicensis*, representando así la segunda especie de micoplasma hemotrópica encontrada en gatos domésticos de Costa Rica.

- Se reporta por primera vez la presencia de *M. haemocanis* en mapaches (*Procyon lotor*) de Costa Rica.
- Se reporta por primera vez la presencia de *M. canadense*, *M. californicum* y *M. bovigenitalium* en semen de toros de Costa Rica.

## 6. Recomendaciones

- Continuar con una búsqueda activa y mantener un constante monitoreo de micoplasmas en las poblaciones domésticas y silvestres de Costa Rica.
- Controlar en granjas porcinas la presencia de *M. hyorhinitis*, y otras especies de micoplasmas para prevenir pérdidas económicas por enfermedad.
- Estudiar especies de micoplasmas en bovinos y su asociación con enfermedades reproductivas, mastitis, y artritis en diferentes hatos ganaderos nacionales.

## 7. Bibliografía

- Andrade-Becerra, R. J., Caro-Carvajal, Z., Pulido-Medellin, M., & Lopez-Cepeda, M. (2014). Prevalencia de Mycoplasma spp. En fincas lecheras del altiplano Boyacense (Colombia). *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient*, 2(17), 461–466.
- André, M. R., Adania, C. H., Allegretti, S. M., & Machado, R. Z. (2011). Hemoplasmas in Wild Canids and Felids in Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 42(2), 342–347. <https://doi.org/10.1638/2010-0198.1>
- Arfi, Y., Lartigue, C., Sirand-Pugnet, P., & Blanchard, A. (2021). Beware of Mycoplasma Anti-immunoglobulin Strategies. *mBio*, 12(6), e01974-21. <https://doi.org/10.1128/mBio.01974-21>
- Arguedas-Herrera, J., Solorzano-Morales, A., Jimenez-Soto, M., Vega, K., & Dolz. (2023). *Presencia de retrovirus y agentes transmitidos por artropodos en felinos domesticos del Pacifico Central de Costa Rica*.
- Behera, S., Rana, R., Gupta, P. K., Kumar, D., Sonal, Rekha, V., Arun, T. R., & Jena, D. (2018). Development of real-time PCR assay for the detection of Mycoplasma bovis. *Tropical Animal Health and Production*, 50(4), 875–882. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1510-1>
- Bünger, M., Brunthaler, R., Unterweger, C., Loncaric, I., Dippel, M., Ruczizka, U., Schwarz, L., Griessler, A., Voglmayr, T., Verhovsek, D., Ladinig, A., & Spargser, J. (2020). Mycoplasma hyorhinitis as a possible cause of fibrinopurulent meningitis in

- pigs? - A case series. *Porcine Health Management*, 6, 38.  
<https://doi.org/10.1186/s40813-020-00178-8>
- Bradley, C. A., & Altizer, S. (2007). Urbanization and the ecology of wildlife diseases. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(2), 95–102.  
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.11.001>
- Cantón, G., Llada, I., Margineda, C., Urtizbiría, F., Fanti, S., Scioli, V., Fiorentino, M. A., Louge Uriarte, E., Morrell, E., Sticotti, E., & Tamiozzo, P. (2022). Mycoplasma bovis-pneumonia and polyarthritis in feedlot calves in Argentina: First local isolation. *Revista Argentina de Microbiología*, 54(4), 299–304.  
<https://doi.org/10.1016/j.ram.2022.02.005>
- Cerdá, R., Xavier, J., Sansalone, P., Sota, R. de la, & Rosenbush, R. (2000). Aislamiento de Mycoplasma bovis a partir de un brote de mastitis bovina en una vaquería de la provincia de Buenos Aires. Primera comunicación en la República Argentina. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42(1), 7–12.
- Clavijo, M. J., Murray, D., Oliveira, S., & Rovira, A. (2017). Infection dynamics of Mycoplasma hyorhinis in three commercial pig populations. *Veterinary Record*, 181(3), 68–68. <https://doi.org/10.1136/vr.104064>
- Congli, Y., Hong, Y., Zhonghai, Z., Zhibiao, Y., Li, C., Jianguo, Z., & Xiuguo, H. (2011). Prevalence of Mycoplasma wenyonii Infection on Seven Dairy Farms in Shanghai, China. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 41(2), 177–182.  
<https://doi.org/10.56808/2985-1130.2294>
- Correia dos Santos, L., Vidotto, O., dos Santos, N. J. R., Ribeiro, J., Pellizzaro, M., dos Santos, A. P., Haisi, A., Wischral Jayme Vieira, T. S., de Barros Filho, I. R., Cubilla, M. P., Araujo, J. P., da Costa Vieira, R. F., Ullmann, L. S., & Biondo, A. W. (2020). Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas) in free-ranging bats from Southern Brazil. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 69, 101416.  
<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101416>
- Dacak, D., Petters, J., Batista-Cirne, L., Lucero, M., Aliendre, R., Guzmán, J., Ordóñez, R., Dacak, D., Petters, J., Batista-Cirne, L., Lucero, M., Aliendre, R., Guzmán, J., & Ordóñez, R. (2021). Primer reporte de micoplasmosis en Procyon cancrivorus en cautiverio en Asunción, Paraguay. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 32(1). <https://doi.org/10.15381/rivep.v32i1.19494>
- David Engel, L., & Kenny, G. E. (1970). Mycoplasma salivarium in human gingival sulci. *Journal of Periodontal Research*, 5(3), 163–171. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1970.tb00711.x>
- Deeney, A. S., Collins, R., & Ridley, A. M. (2021). Identification of Mycoplasma species and related organisms from ruminants in England and Wales during 2005–2019. *BMC Veterinary Research*, 17, 325. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-03037-y>

- Di Cataldo, S., Hidalgo-Hermoso, E., Sacristán, I., Cevidanes, A., Napolitano, C., Hernández, C. V., Esperón, F., Moreira-Arce, D., Cabello, J., Müller, A., & Millán, J. (2020). Hemoplasmas Are Endemic and Cause Asymptomatic Infection in the Endangered Darwin's Fox (*Lycalopex fulvipes*). *Applied and Environmental Microbiology*, *86*(12), e00779-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.00779-20>
- Dos Santos, L. F., Sreevatsan, S., Torremorell, M., Moreira, M. A. S., Sibila, M., & Pieters, M. (2015). Genotype distribution of *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine herds from different geographical regions. *Veterinary Microbiology*, *175*(2–4), 374–381. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.11.018>
- Duarte, A., Marques, V., Correia, J. H. D., Neto, I., Bráz, B. S., Rodrigues, C., Martins, T., Rosado, R., Ferreira, J. P., Santos-Reis, M., & Tavares, L. (2015). Molecular detection of haemotropic *Mycoplasma* species in urban and rural cats from Portugal. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, *17*(6), 516–522. <https://doi.org/10.1177/1098612X14550172>
- Dudek, K., Szacawa, E., & Nicholas, R. A. J. (2021). Recent Developments in Vaccines for Bovine Mycoplasmoses Caused by *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *Mycoides*. *Vaccines*, *9*(6), 549. <https://doi.org/10.3390/vaccines9060549>
- Fagundes-Moreira, R., Souza, U. A., de Souza, V. K., Bidone, N. de B., May-Júnior, J. A., Baggio-Souza, V., Mendonça, R. Á., Fagundes, D. D., Lorenzo, C. de, Wartchow, B. S., Caldart, E. T., Giroto-Soares, A., Alievi, M. M., Valle, S. de F., & Soares, J. F. (2023). Molecular survey of hemotropic mycoplasmas in crab-eating raccoons (*Procyon cancrivorus*) in southern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, *32*, e012322. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612023009>
- Fritschi, J., Marti, H., Seth-Smith, H. M. B., Aeby, S., Greub, G., Meli, M. L., Hofmann-Lehmann, R., Mühldorfer, K., Stokar-Regenscheit, N., Wiederkehr, D., Pilo, P., Van Den Broek, P. R., & Borel, N. (2020). Prevalence and phylogeny of Chlamydiae and hemotropic mycoplasma species in captive and free-living bats. *BMC Microbiology*, *20*, 182. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01872-x>
- Gautier-Bouchardon, A. V. (2018). Antimicrobial Resistance in *Mycoplasma* spp. *Microbiology Spectrum*, *6*(4), 6.4.07. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0030-2018>
- Gioia, G., Addis, M. F., Santisteban, C., Gross, B., Nydam, D. V., Sipka, A. S., Virkler, P. D., Watters, R. D., Wieland, M., Zurakowski, M. J., & Moroni, P. (2021). *Mycoplasma* species isolated from bovine milk collected from US dairy herds between 2016 and 2019. *Journal of Dairy Science*, *104*(4), 4813–4821. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19171>

- Hata, E., Nagai, K., & Murakami, K. (2017). Complete Genome Sequence of *Mycoplasma bovis* Strain HAZ 596 from a Bovine Vagina in Japan. *Genome Announcements*, 5(6). <https://doi.org/10.1128/genomeA.01554-16>
- Infante-Martínez, F., Aguado, J., & Eduard-Jasper, D. (1999). Mastitis outbreak due to *Mycoplasma californicum* and *Mycoplasma canadense* in a commercial dairy herd in the state of Jalisco, México. *Revista Latinoamericana De Microbiologia*, 41(3), 117–120.
- Johnson, S. M., Bruckner, F., & Collins, D. (2007). Distribution of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma salivarium* in the Synovial Fluid of Arthritis Patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(3), 953–957. <https://doi.org/10.1128/jcm.01973-06>
- Klein, U., Földi, D., Belec, N., Hrivnák, V., Somogyi, Z., Gastaldelli, M., Merenda, M., Catania, S., Dors, A., Siesenop, U., Vyt, P., Kreizinger, Z., Depondt, W., & Gyuranecz, M. (2022). Antimicrobial susceptibility profiles of *Mycoplasma hyorhinis* strains isolated from five European countries between 2019 and 2021. *PLoS ONE*, 17(8), e0272903. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272903>
- Kong, F., James, G., Gordon, S., Zelynski, A., & Gilbert, G. L. (2001). Species-Specific PCR for Identification of Common Contaminant Mollicutes in Cell Culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 3195–3200. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.3195-3200.2001>
- Koshimizu, K., Magaribuchi, T., Yamamoto, K., & Ogata. (1975). *Characterization of Mycoplasmas isolated from imported nonhuman primates.*
- Levy, J. K., Lappin, M. R., Glaser, A. L., Birkenheuer, A. J., Anderson, T. C., & Edinboro, C. H. (2011). Prevalence of infectious diseases in cats and dogs rescued following Hurricane Katrina. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 238(3), 311–317. <https://doi.org/10.2460/javma.238.3.311>
- Lin, J. H., Chen, S. P., Yeh, K. S., & Weng, C. N. (2006). *Mycoplasma hyorhinis* in Taiwan: Diagnosis and isolation of swine pneumonia pathogen. *Veterinary Microbiology*, 115(1), 111–116. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.02.004>
- Luehrs, A., Siegenthaler, S., Grützner, N., grosse Beilage, E., Kuhnert, P., & Nathues, H. (2017). Occurrence of *Mycoplasma hyorhinis* infections in fattening pigs and association with clinical signs and pathological lesions of Enzootic Pneumonia. *Veterinary Microbiology*, 203, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.02.001>
- Marcondes, M., Hirata, K. Y., Vides, J. P., Sobrinho, L. S. V., Azevedo, J. S., Vieira, T. S. W. J., & Vieira, R. F. C. (2018). Infection by *Mycoplasma* spp., feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus in cats from an area endemic for

visceral leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, *11*, 131. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2716-9>

Matas Andreu, L., Molinos Abós, S., Fernández Rivas, G., González Soler, V., & Ausina Ruiz, V. (2006). Diagnóstico serológico de las infecciones por *Mycoplasma pneumoniae*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *24*, 19–23. [https://doi.org/10.1016/S0210-5705\(09\)71003-9](https://doi.org/10.1016/S0210-5705(09)71003-9)

Meseguer-Peinado, M. A., Acosta-Boga, B., Matas-Andreu, L., & Codina-Grau, G. (2012). Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Mycoplasma pneumoniae*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *30*(8), 500–504. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.10.020>

Miranda Morales, R. E., Rojas Trejo, V., López-Cerino, L. E., Carrillo Casas, E. M., Sarmiento Silva, R. E., Trujillo Ortega, M. E., Beltrán Figueroa, R., Trigo Tavera, F. J., Miranda Morales, R. E., Rojas Trejo, V., López-Cerino, L. E., Carrillo Casas, E. M., Sarmiento Silva, R. E., Trujillo Ortega, M. E., Beltrán Figueroa, R., & Trigo Tavera, F. J. (2020). Frecuencia de *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* y *M. hyosynoviae* en muestras nasales y de pulmón de cerdos con síntomas de neumonía enzoótica porcina. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, *11*(4), 946–960. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i4.5124>

Moiso, N., Pieters, M., Degano, F., Vissio, C., Camacho, P., Estanguet, A., Parada, J., & Tamiozzo, P. J. (2020). Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nasal and laryngeal swab specimens in endemically infected pig herds. *The Veterinary Record*, *186*(1), 27. <https://doi.org/10.1136/vr.105525>

Nicholas, R. A. J., & Ayling, R. D. (2003). *Mycoplasma bovis*: Disease, diagnosis, and control. *Research in Veterinary Science*, *74*(2), 105–112. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(02\)00155-8](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(02)00155-8)

Peters, I. R., Helps, C. R., McAuliffe, L., Neimark, H., Lappin, M. R., Gruffydd-Jones, T. J., Day, M. J., Hoelzle, L. E., Willi, B., Meli, M., Hofmann-Lehmann, R., & Tasker, S. (2008). RNase P RNA Gene (*rnpB*) Phylogeny of Hemoplasmas and Other *Mycoplasma* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, *46*(5), 1873–1877. <https://doi.org/10.1128/JCM.01859-07>

Rodríguez-Mirabal, E., Roblejo-Arias, L., Fonseca-Rodríguez, O., Vega-Cañizares, E., & Lobo-Rivero, E. (2021). Ocurrencia de estructuras compatibles con hemoplasmas en caninos no domiciliados de Cuba. *Revista de Salud Animal*, *43*(1). [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0253-570X2021000100004&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0253-570X2021000100004&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

Rosenqvist, M. B., Meilstrup, A.-K. H., Larsen, J., Olsen, J. E., Jensen, A. L., & Thomsen, L. E. (2016). Prevalence of feline haemoplasma in cats in Denmark. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *58*, 78. <https://doi.org/10.1186/s13028-016-0260-1>

- Santos Junior, M. N., de Macêdo Neres, N. S., Campos, G. B., Bastos, B. L., Timenetsky, J., & Marques, L. M. (2021). A Review of *Ureaplasma diversum*: A Representative of the Mollicute Class Associated With Reproductive and Respiratory Disorders in Cattle. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 572171. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.572171>
- Sawicka, A., Durkalec, M., Tomczyk, G., & Kursa, O. (2020). Occurrence of *Mycoplasma gallisepticum* in wild birds: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 15(4), e0231545. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231545>
- Sawicka-Durkalec, A., Kursa, O., Bednarz, Ł., & Tomczyk, G. (2021). Occurrence of *Mycoplasma* spp. in wild birds: Phylogenetic analysis and potential factors affecting distribution. *Scientific Reports*, 11, 17065. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96577-0>
- Sirand-Pugnet, P., Citti, C., Barré, A., & Blanchard, A. (2007). Evolution of mollicutes: Down a bumpy road with twists and turns. *Research in Microbiology*, 158(10), 754–766. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.09.007>
- Sosa, C., Tirante, L., Chaves, J., Pol, M., Ambrogi, A., Giraud, J. A., & Tamiozzo, P. (2018). Identificación de especies de *Mycoplasma* y de *Ureaplasma diversum* en rodeos lecheros de Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(1), 31–35. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.02.010>
- Sumithra, T. G., Chaturvedi, V. K., Susan, C., Siju, S. J., Rai, A. K., Harish, C., & Sunita, S. C. (2013). Mycoplasmosis in wildlife: A review. *European Journal of Wildlife Research*, 59(6), 769–781. <https://doi.org/10.1007/s10344-013-0769-9>
- Tamiozzo, P. J., Estanguet, A. A., Maito, J., Tirante, L., Pol, M., & Giraud, J. A. (2014). Detection of *Mycoplasma canadense* and *Mycoplasma californicum* in dairy cattle from Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(2), 119–121. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70059-8](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70059-8)
- Thomas, A. (2004). Conservation of the *uvrC* gene sequence in *Mycoplasma bovis* and its use in routine PCR diagnosis. *The Veterinary Journal*, 168(1), 100–102. [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(03\)00186-2](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(03)00186-2)
- van Kuppeveld, F. J., Johansson, K. E., Galama, J. M., Kissing, J., Bölske, G., van der Logt, J. T., & Melchers, W. J. (1994). Detection of mycoplasma contamination in cell cultures by a mycoplasma group-specific PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(1), 149–152.
- Volokhov, D. V., Hwang, J., Chizhikov, V. E., Danaceau, H., & Gottdenker, N. L. (2017). Prevalence, Genotype Richness, and Coinfection Patterns of Hemotropic Mycoplasmas in Raccoons (*Procyon lotor*) on Environmentally Protected and Urbanized Barrier Islands. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(9), e00211-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00211-17>

## Artículo II

### Baja frecuencia de *Mycoplasma* spp. y análisis de otras bacterias aisladas a partir de leche de vacas con mastitis y leche de tanque de Costa Rica.

#### Resumen

La mastitis bovina un problema económico significativo en la industria lechera, y es causada principalmente por bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* y *Escherichia coli*. Sin embargo, también se han reportado especies de *Mycoplasma*, que se destacan por su alta contagiosidad, siendo *Mycoplasma bovis* la especie más relevante a nivel mundial. Esta bacteria frecuentemente causa mastitis subclínica, lo que dificulta su diagnóstico, además, es resistente a antibióticos que afectan la pared celular, como los  $\beta$ -lactámicos. El objetivo de este estudio fue estimar la frecuencia de especies de *Mycoplasma* mediante técnicas moleculares y de otras bacterias mediante técnicas de cultivo tradicional a partir de leche de vacas con mastitis y leche de tanque de fincas lecheras especializadas de Costa Rica. Se analizaron un total de 695 muestras de leche y 132 muestras de leche de tanque, las cuales fueron recolectadas entre marzo y junio de 2023. Para la detección de *Mycoplasma* spp. y *Mycoplasma canadense* se amplificaron los genes ARNr 16S, para *Mycoplasma californicum* y *Mycoplasma bovis* los genes *rpo*  $\beta$  y para *Mycoplasma bovis* el gen *uvrC*. Además, se obtuvo la siguiente información de cada muestra de leche individual: resultado del cultivo bacteriano y resultado del antibiograma. Se detectó por primera vez en Costa Rica la presencia de *M. californicum* en una muestra compuesta de leche de vaca, las demás muestras analizadas resultaron negativas. En las muestras de leche con cultivadas, se evidenciaron 66 especies bacterianas, siendo *S. aureus*, *S. uberis*, *S. aureus* y *E. coli* las más frecuentemente aisladas. Se observó una alta resistencia de *S. aureus* a enrofloxacin (96%) y de *S. uberis* a penicilina (15,6%), lo que subraya la importancia de considerar la resistencia bacteriana en el tratamiento de la mastitis. Este estudio demuestra que, aunque *Mycoplasma* tiene una presencia baja en Costa Rica, no debe dejar de pensarse como una causa de mastitis pudiendo causar impacto en la salud del ganado y la producción lechera, especialmente en casos de vacas con mastitis refractarias a tratamientos que han demostrado eficacia para casos similares en fincas.

**Palabras claves:** Mastitis, Reacción en Cadena de la Polimerasa, secuenciación, epidemiología, lechería, biología molecular, resistencia antimicrobiana.

## **Abstract**

Bovine mastitis remains a significant economic problem in the dairy industry. This disease is mainly caused by bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and *Escherichia coli*. However, mastitis caused by *Mycoplasma* spp. has been highlighted for its severity and high contagiousness with *Mycoplasma bovis*, being the most relevant species worldwide. This bacterium frequently causes subclinical mastitis, which makes its diagnosis difficult. In addition, it is resistant to antibiotics that affect the cell wall, such as  $\beta$ -lactams. This research aimed to estimate the frequency of *Mycoplasma* species and other bacteria isolated by traditional culture from mastitis milk from cows and tank milk from specialized dairy farms in Costa Rica. The study included 695 milk samples from cows diagnosed with mastitis and 132 bulk-tank milk samples collected between March and June 2023. *Mycoplasma californicum* was detected for the first time in Costa Rica in a composite sample of cow's milk; the other samples analyzed were negative. A total of 66 bacterial species were isolated in the milk samples with mastitis, establishing *S. non-aureus*, *S. uberis*, *S. aureus*, and *E. coli* as the most frequently isolated bacteria and high resistance was established, and a high resistance of *S. aureus* to enrofloxacin (96%) and of *S. uberis* to penicillin (15.6%) was established, which underlines the importance of considering bacterial resistance in the treatment of mastitis. This study demonstrates that, although *Mycoplasma* has a low presence in Costa Rica, it should be considered as a cause of mastitis and that can cause an impact on the health of livestock and milk production, especially in cases of cows with mastitis refractory to treatments that have proven effective for similar cases on farms.

**Keywords:** Mastitis, Polymerase Chain Reaction, sequencing, epidemiology, dairy, molecular biology, antimicrobial resistance.

## 1. Introducción

La mastitis bovina es una enfermedad multifactorial, ocasionada principalmente por agentes bacterianos que pueden ser de origen infectocontagioso o ambiental, se consideran como microorganismos causales de mastitis contagiosa aquellos que son transmitidos durante el ordeño de una vaca a otra, como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y especies de *Mycoplasma*, que son capaces de vivir dentro de la glándula mamaria y ocasionar enfermedades subclínicas. Además, existen bacterias Gram negativas y Gram positivas como *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, que se encuentran en el medio ambiente, considerados como invasores oportunistas que generan respuesta inmune, pero se eliminan rápidamente.

La mastitis es una patología de mucha importancia, que ocasionan muchas pérdidas económicas en la industria lechera (Bradley, 2002, Sharun et al., 2021), según Hogeveen et al. (2019) las pérdidas por vaca se calcularon en USD 147 anualmente, lo que supone una merma en la producción lechera que oscila entre 94\$ y 157\$ por 1,000 kg de leche, y representa un 11-18% de la producción total de las granjas lecheras.

A lo largo del tiempo se han identificado más de 137 patógenos como causales de esta enfermedad, incluyendo bacterias, levaduras, y algas (Watts, 1988), la relación entre agente infeccioso y mastitis se estableció aproximadamente en 1880, pero no fue hasta la década entre 1950-1960 que se identificaron los principales microorganismos patógenos causales de esta enfermedad (Kour et al., 2023). En la actualidad la mastitis representa una enfermedad común en el ámbito lechero donde el control es de vital importancia, aunque debido a su naturaleza multifactorial es considerada de difícil control y erradicación (Ashraf & Imran, 2020). Para los seres humanos controlar esta patología es de suma importancia debido a que puede representar un problema a nivel de salud pública dado al alto consumo leche y sus derivados, que pueden contener bacterias con genes de resistencia antibiótica, generando un impacto negativo en la salud (Sharun et al., 2021).

La mastitis ocasionada por *Mycoplasma* spp. es menos común, pero más grave y contagiosa que las ocasionadas por patógenos tradicionales, debido a su resistencia natural a antibióticos que actúan sobre la pared celular (Andrade-Becerra et al., 2014; Nicholas et al., 2016). *Mycoplasma bovis* es la especie de mayor importancia en casos de mastitis a nivel mundial, sin embargo, existen otras especies de este género relacionadas con el complejo de enfermedades respiratorias y mastitis en bovinos, entre ellas

*Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma canadense*, *Mycoplasma californicum*, *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma alkalense*, y *Mycoplasma bovis* (Bushnell, 1984; Sosa et al., 2018).

El primer caso de mastitis bacteriana reportada fue en el año 1917 en New York, Estados Unidos de América, siendo *Streptococcus* la bacteria encontrada con mayor frecuencia (Breed & Brew, 1917). En el caso de la mastitis ocasionada por *Mycoplasma* el primer caso reportado fue en Inglaterra en la década de 1960, identificando a *M. bovis* como la especie causal (Andrade-Becerra et al., 2014). En el continente americano el primer brote de mastitis por *Mycoplasma* fue reportado en EEUU en 1961 (Hale et al., 1962), identificando a *M. bovis* como el agente etiológico de la enfermedad (Fox, 2012), después de los reportes en EEUU en 1960, la mastitis por *Mycoplasma* en rebaños bovinos comenzó a reportarse en otras partes del mundo, incluidos España, Francia, Israel, Australia, Gran Bretaña y Alemania (Nicholas & Ayling, 2003).

La principal forma de ingreso de *Mycoplasma* en los rebaños es por la entrada de animales infectados (Dudek et al., 2021). Los bovinos pueden excretar la bacteria durante meses y en forma intermitente con la leche (Suzuki et al., 2024). El agente se considera altamente contagioso, y la mastitis se caracteriza por que afecta a más de un cuarto mamario, se disminuye significativamente la producción de leche, aumenta el conteo de células somáticas, y se altera el porcentaje de proteína de la leche y en algunos casos se puede presentar de manera subclínica (Gelgie et al., 2022; Nicholas et al., 2016).

El estándar de oro para el diagnóstico bacteriológico es el cultivo tradicional, sin embargo, en el caso de *Mycoplasma* debido a su complejidad y comportamiento fastidioso, el cultivo suele resultar caro, lento y poco sensible, además de requerir personal altamente capacitado, siendo lo ideal que el diagnóstico sea temprano, rápido y certero (Kour et al., 2023, Matas Andreu et al., 2006). Actualmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sustituido las técnicas de cultivo tradicional dado su alta sensibilidad y especificidad (Sawicka et al., 2020).

El tratamiento antibiótico de elección para la mastitis clínica por agentes bacterianos comunes debe basarse tomando en cuenta principalmente la historia clínica, la bacteria identificada y los resultados del perfil de sensibilidad antibiótica (Sharun et al., 2021), en el caso de las diferentes especies de *Mycoplasma* se usan antibióticos que inhiben la síntesis proteica y de ácidos nucleicos como tetraciclinas, fluoroquinolonas,

aminoglucósidos, anfenícolos, macrólidos y lincosamidas, debido a la carencia de pared celular de las micoplasmas, no se recomienda el uso de  $\beta$ -lactámicos, ya que son resistentes a esta familia de antibióticos (Klein et al., 2022).

Los patógenos aislados con mayor frecuencia en casos típicos de mastitis son los *S. no aureus*, *S. aureus*, *S. agalactiae* y *S. uberis* (Sharun et al., 2021, Vakkamäki et al., 2017). Un estudio realizado por Abebe y colaboradores (2016) en rebaños lecheros en el sur de Etiopía, utilizando técnicas de cultivo tradicional establecieron una prevalencia del 51,2% de *S. aureus* en el 73,2% de los rebaños analizados, mientras que en Colombia Andrade-Becerra y colaboradores (2014), detectaron mediante técnicas de cultivo tradicional la presencia de *M. californicum* y *M. alkalenses* en un 1,5% y un 3,0% de muestras de leche mastítica, respectivamente. Este estudio se realizó durante de tres años analizando la leche, mediante cultivo con medio Hayflick y pruebas bioquímicas para diferenciar las especies de *Mycoplasma*. En contraste, los estudios realizados por Velasco-Bolaños y colaboradores (2022), en el que analizaron la leche de tanque de 220 lecherías comerciales en Colombia utilizando el cultivo en medio Hayflick y técnicas moleculares amplificando la región ITS 16S – 23S ARNr no logró aislar ninguna especie de *Mycoplasma*.

En Costa Rica y Centro América no existen estudios que demuestren la presencia de especies de *Mycoplasma* ocasionando mastitis en la industria lechera, esto debido a la dificultad de aislarlas e identificarlas, sin embargo en Costa Rica Solano y colaboradores (2009) analizaron 750 muestras compuestas de animales con mastitis clínica y subclínica con el fin de identificar los agentes bacterianos causantes de la mastitis y su patrón de sensibilidad a los antibióticos, encontrando predominio *S. agalactiae* (16.6%), *S. aureus* (16.4%), *Corynebacterium* spp. (12.5%), *S. uberis* (12.2%), *S. no aureus* (10.8%) y *S. dysgalactiae* (7.4%). Con respecto a las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos, *S. agalactiae* mostró una alta resistencia al grupo de los aminoglucósidos (igual que *S. uberis*), tetraciclinas, macrólidos, lincosamidas y fluoroquinolonas. Los estafilococos, distintos de los estreptococos, presentaron su mayor resistencia al grupo de los betalactámicos. Los bacilos Gram negativos mostraron una alta resistencia al grupo de los betalactámicos y las cefalosporinas, en contraste, la gentamicina, apramicina y la colistina fueron los antibióticos ante los que se presentó menor resistencia (Solano, 2009). El objetivo de este trabajo fue estimar la frecuencia de especies de *Mycoplasma* y otras bacterias aisladas, mediante técnicas moleculares y cultivo tradicional, respectivamente,

presentes en leche de vacas con mastitis y en leche de tanque de fincas lecheras especializadas, además, establecer la resistencia a antibióticos de las bacterias aisladas.

## **2. Materiales y métodos**

### **2.1 Tipo de estudio, tipo de muestra e información de las muestras**

Se realizó un estudio transversal descriptivo, no probabilístico y por conveniencia, en dos grupos de muestras: el primer grupo eran muestras de leche de vacas diagnosticadas con mastitis, y el segundo grupo, muestras de leche de tanque de donde provenían las vacas con mastitis. Las muestras fueron remitidas durante tres meses (marzo a junio 2023) por el Laboratorio de Análisis de Calidad de la Leche de la Cooperativa de Productores de Leche Dos Pinos R. L. Cada una de estas muestras venía acompañada de los resultados individuales de cultivo bacteriano (obtenidos en placas de Agar Sangre, MacConkey y Manitol Sal), identificación del género y especie de las bacterias aisladas y resultado del antibiograma para cada aislamiento. Los resultados de identificación y antibiograma fueron obtenidos mediante el equipo automatizado VITEK®2 (BioMérieux) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la identificación de las bacterias se utilizó las tarjetas GP y GN para bacterias Gram positivas y Gram negativas respectivamente. Los antibiogramas utilizaron tres tarjetas de susceptibilidad antimicrobiana, AST-ST03, AST GP80 y AST-GN97: para *Streptococcus* spp., Gram positivas y Gram negativas respectivamente.

Para *Streptococcus* spp. se probaron 8 antibióticos: Tetraciclina (TCY), Gentamicina (GEN), Trimetoprima/Sulfametoxazol (SXT), Eritromicina (ERI), Bencilpenicilina (PG), Ampicilina (AMP), Amoxicilina (AMX), Amoxicilina/Ácido clavulánico (AMC), para Gram positivas 16 antibióticos: PG, GEN, ERI, SXT, TCY, Oxacilina (OXA), Ceftiofur (EFT), Kanamicina (KAN), Enrofloxacino (ENR), Marbofloxacino (MAR), Pradofloxacina (PRA), Clindamicina (CLI), Doxiciclina (DOX), Cloranfenicol (CHL), Neomicina (NEO), Cefovecina (CVN) y para Gram negativas se probaron 18 antibióticos: CVN, PG, TCY, DOX, AMC, ENR, GEN, PRA, AMP, EFT, CHL, SXT, NEO, MAR, Cefalotina (CEP), Cefpodoxima (CPD), Nitrofurantoina (NIT), Amikacina (AK). Los resultados de los antibiogramas se interpretaron de acuerdo con la guía del Instituto de Guías de Estándares Clínicos y Laboratoriales (CLSI M100) para uso veterinario del año 2023 (CLSI, 2023). En el caso de las muestras de leche de tanque se proporcionaron los

resultados del conteo de células somáticas, las cuales se determinaron por medio citometría de flujo con el equipo Fossomatic™ 7.

## **2.2 Tamaño y tipo de muestra**

Se remitieron un total de 695 muestras de leche individual, las cuales se analizaron para *Mycoplasma* spp. mediante PCR en grupos de cinco muestras, para un total de 139 muestras compuestas. Las muestras compuestas que resultaron positivas en PCR se analizaron en forma individual. Además, se analizaron 132 muestras de leche de tanque de manera individual. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su procesamiento.

## **2.3 Extracción de ADN**

La extracción de ADN de las muestras de leche se realizó con el kit comercial QIAGEN, utilizando el protocolo descrito por Volk et al. (2014), con las siguientes modificaciones: las muestras de leche se dejaron sedimentando toda la noche a 4 °C, se centrifugaron a 6800 g durante 5 minutos a 4 °C, y el botón de células se resuspendió con 500 µL de solución salina estéril (0.9%) para eliminar el exceso de proteínas y grasa. Seguidamente se centrifugó de nuevo como descrito arriba, se descartó el sobrenadante y se agregó 250 µL de PBS (0,1M, pH 7,2), 225 µL de buffer de lisis AL de QIAGEN y 25 µL de proteinasa K, y se incubó durante 3 horas a 50 °C. Seguidamente se agregó 250 µL de fenol, 240 µL de cloroformo y 10 µL de alcohol isoamílico a cada muestra (extracción fenol cloroformo), se centrifugó a 14,000 g durante 5 minutos a 4 °C, se recolectó 300 µL del sobrenadante el cual se depositó en un tubo con 200 µL de etanol absoluto. Finalmente se continuó con los lavados del kit comercial de QIAGEN siguiendo los protocolos del fabricante. El ADN extraído se cuantificó en el equipo NanoDrop (Thermo Scientific) y se almacenó a -20°C hasta su procesamiento. Las muestras se analizaron posteriormente mediante técnicas de biología molecular (PCR y secuenciación) para establecer la presencia de especies de *Mycoplasma*.

## **2.4 Detección molecular de especies de *Mycoplasma***

### **2.4.1 PCR en tiempo real (qPCR) para la detección de *M. bovis***

La detección de *M. bovis* se realizó mediante un qPCR con los iniciadores Forward 5'-AAGTTGAAGTTGACCGGTTTG-3' y Reverse 5'-TCCATATTTGGACCTAGTCCTTT-3', que amplificaron un segmento de 106 pb del gen de reparación *uvrC* (Thomas, 2004) y usando el protocolo de Behera y colaboradores (2018) con algunas modificaciones: se usó 0,5 µL de cada primer, en concentración de 10

uM, 1 µL de ADN, 5,2 µL del super mix SoFast EvaGreen con Low ROX, de la casa comercial Bio Rad, 2,8 µL de agua libre de nucleasas, para un volumen final de reacción de 10 µL. Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador QuantStudio 3 de Applied Biosystems, Las condiciones de ciclados consistieron en una desnaturalización inicial de 95 °C durante 1 minuto, seguidos de 40 ciclos de 95 °C durante 1 minuto, 60 °C durante 10 segundos, y finalmente un estado de disociación de 55–95 °C. Se consideraron positivas todas las muestras que amplificaron antes de los 35 ciclos y cuya temperatura de disociación concordara con la del control positivo.

#### **2.4.2 PCR para detección de *Mycoplasma* spp.**

Para identificar la presencia de alguna especie de *Mycoplasma* se amplificó un fragmento del gen ARNr 16S de tamaño 780 pb mediante PCR convencional, utilizando los iniciadores GPO-1 F 5'- ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA-3' y MGSO R 5'- TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC-3' (Kong et al., 2001; van Kuppeveld et al., 1994). Se preparó una mezcla con volumen final de 12,5 ul, utilizando 6,25 µL de mezcla maestra DreamTaq (1X) de la casa comercial Thermo Scientific™, 1 µL de cada primer, en concentración de 10 uM, 1,75 µL de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas y 2,5 µL de ADN. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador de punto final de la marca ProFlex TM 3 x 32 Well (Applied Biosystem) con las siguientes condiciones de ciclado: desnaturalización inicial de 95 °C por 3 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 30 seg, 55 °C por 30 seg, 72 °C por 30 seg, y una extensión final a 72 °C por 5 min.

#### **2.4.3 PCR para detección de *M. canadense*, *M. californicum* y *M. bovis genitalium***

Para la detección de especies seleccionadas de *Mycoplasma* se diseñaron iniciadores y se estandarizaron tres PCR convencionales de la siguiente manera: Para *M. canadense* se diseñaron los iniciadores \_16SF 5'ATTCCACAATGAGCGAAAGC-3' y 16SR 5'- CCACCGACTAATGATCATCG-3' para amplificar un fragmento del gen ARNr 16S de 470pb de tamaño, para *M. bovis genitalium* se utilizaron los iniciadores MbvgrpBF 5'- CATGGACCAAATCAACCCAC-3' y MbvgrpBR, 5'- GTCAATTTTCGTCAGCTGAGG-3' para amplificar un fragmento de 416pb del gen rpo β y para *M. californicum* se diseñaron los iniciadores: McalrpoBF 5'- ACTCGGCACTTAGACGAAAG-3' y McalrpoBR 5'-TCAACTGGCGTACCATCTTC-3' para amplificar un fragmento del gen rpo β con un tamaño de 404pb. Para las reacciones se preparó una mezcla con volumen final de 12,5 µL, utilizando 6,25 µL de mezcla maestra DreamTaq (1X) de la casa comercial Thermo Scientific™, 1 µL de cada

primer, en concentración de 10 uM, 1,75 µL de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas y 2,5 µL de ADN. Para la determinación de ADN de *M. canadense* y *M. californicum* se realizó una desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 seg, 56°C por 30 seg, 72°C por 45 seg y una extensión final a 72°C por 5 min. Para la detección de ADN de *M. bovis genitalium* se realizó una desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 seg, 52°C por 1 min, 72°C por 45 seg y una extensión final a 72°C por 5 min.

#### **2.4.4 Visualización de productos amplificados y secuenciación**

Los productos amplificados en los PCR convencionales se visualizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%, con buffer TBE, que utilizó buffer de carga 6X con el colorante Gel Red y un marcador de peso molecular de la marca GeneRuler 100pb plus DNA Ladder, de la casa comercial Thermo Scientific, aplicando corriente de 90 voltios durante 55 minutos. Las muestras que presentaron un fragmento aproximadamente de 780 pb, 470 pb, 416 pb, y 404 pb se consideraron positivas por *Mycoplasma* spp., *M. canadense*, *M. bovis genitalium* y *M. californicum*, respectivamente y fueron enviados a la compañía MacroGen en Seoul, Corea del Sur, para secuenciación utilizando la técnica de Sanger. Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa BioEdit y se compararon con las secuencias disponibles en la base de datos de GenBank mediante la utilización del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

### **3. Análisis estadístico**

Para este estudio se realizó estadística descriptiva, cuyo objetivo fue organizar y resumir los resultados del cultivo bacteriano, VITEK®2, antibiograma, conteo de células somáticas y de las técnicas moleculares realizando una base de datos en Excel (Microsoft®), determinando la frecuencia de las bacterias aisladas y el patrón de resistencia a antibióticos, estos análisis se realizaron por medio del programa de cómputo jamovi 2.6.13.

### **4. Resultados**

El total de las 139 muestras compuestas (grupos de 5 leches individuales de vacas con mastitis) y las 132 muestras de tanque de leche resultaron negativas en el PCR convencional de *Mycoplasma* spp. y en el qPCR de *M. bovis*. Con los tres PCR especie específicos desarrollados en el presente trabajo solamente se detectó en una muestra de

las 139 muestras compuestas la presencia de *M. californicum*. Las demás muestras compuestas y muestras de tanque resultaron negativas a *M. californicum*, *M. bovigenitalium* y *M. canadense*. La secuencia de la muestra compuesta P13 positiva a *M. californicum* mostró una identidad nucleotídica de 99,4% (322pb/324pb) con la secuencia AP018943.2 depositada en GenBank y aislada de una muestra de leche de vaca con mastitis en la ciudad de Hokkaido, Akan, Japón. El análisis de las muestras individuales de P13 dieron resultados negativos en PCR de *M. californicum*.

La información recopilada de las muestras individuales de leche de vacas con mastitis fue la siguiente: de un 70,5% (490/695) de las muestras analizadas se logró obtener resultados de aislamiento bacteriano y antibiograma, de las cuales un 19,6% (96/490) de las muestras presentaron coinfecciones, obteniéndose un total de 586 aislamientos. El análisis mediante VITEK®2 logró identificar 66 especies de bacterias, estableciéndose *S. aureus*, *S. uberis*, *S. aureus*, y *E. coli* como las bacterias más frecuentemente aisladas. También se estableció la presencia de otras bacterias como: bacterias Gram positivas otros *Streptococcus*, *K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y otras bacterias Gram negativas (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Bacterias aisladas en muestras de leche de vacas con mastitis clínica, marzo a junio 2023 en fincas de lechería especializada de Costa Rica.

<b>Bacterias</b>	<b>Total de aislamientos</b>	<b>Porcentaje</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	52	8,9
<i>Staphylococcus no aureus</i>	279	47,6
<i>Streptococcus uberis</i>	83	14,2
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	10	1,7
<i>Streptococcus agalactiae</i>	2	0,3
Otros <i>Streptococcus</i>	27	4,6
<i>Escherichia coli</i>	35	6,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	1,4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	1,0
Otras bacterias Gram positivas	10	1,7
Otras bacterias Gram negativas	74	12,6
<b>Total</b>	<b>586</b>	<b>100,0</b>

De las especies de *Streptococcus* aisladas, *S. uberis* mostró mayor resistencia a Penicilina (PG,13/83, 15,7%), mientras que los demás *Streptococcus* presentaron resistencia a diferentes antibióticos (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Resistencia a antibióticos determinada en cepas de *Streptococcus* spp. aisladas de muestras de leche de vacas con mastitis clínica, marzo a junio 2023, en fincas de lechería especializada de Costa Rica.

BACTERIA	ANTIBIOTICO							
	TCY	GEN	SXT	ERI	PG	AMP	AMX	AMC
<i>Streptococcus uberis</i> (n=83)	4	4	2	7	13	2	1	0
<i>Streptococcus agalactiae</i> (n=2)	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> (n=10)	0	0	0	0	0	0	0	0
Otros <i>Streptococcus</i> (n=27)	13	10	9	10	11	7	10	5

Abreviaturas: Tetraciclina (TCY), Gentamicina (GEN), Trimetoprima/Sulfametoxazol (SXT), Eritromicina (ERI), Bencilpenicilina (PG), Ampicilina (AMP), Amoxicilina (AMX), Amoxicilina/Acido clavulánico (AMC).

En el grupo de bacterias Gram positivas, *S. aureus* presentó mayor resistencia a Enrofloxacino (ENR, 50/52, 96,1%) y de igual manera presentaron resistencia a otros antibióticos, la mayor resistencia en cepas *S. no aureus* se encontró para PG (162/279, 58,1%), seguido de ENR (130/272, 46,6%), además se encontró resistencia en los demás antibióticos analizados. Para las otras bacterias Gram positivas se encontró mayor resistencia para ERI y PG (7/10, 70,0% en ambos antibióticos), la resistencia a Oxacilina encontrada en nuestro estudio para *S. aureus* y *S. no aureus* fueron de 23,1% (12/52), y 29,8% (83/279), respectivamente (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Resistencia a antibióticos determinadas en cepas de *Staphylococcus* spp, y otras bacterias Gram positivas aisladas de muestras de leche de vacas con mastitis clínica marzo-junio 2023, en fincas de lechería especializada de Costa Rica.

BACTERIA	ANTIBIOTICO															
	PG	OXA	EFT	KAN	GEN	ENR	MAR	PRA	ERI	CLI	DOX	TCY	CHL	SXT	NEO	CVN
<i>S. aureus</i> (n=52)	21	12	12	7	12	50	1	1	2	9	12	13	1	1	4	12
<i>S. no aureus</i> (n=279)	162	83	96	28	20	130	4	3	69	79	0	68	70	17	17	93
Otras bacterias Gram positivas (n=10)	7	0	0	0	0	2	1	0	7	0	0	2	1	0	0	2

Abreviaturas: PG: Bencipenicilina, OXA: Oxacilina, EFT: Ceftiofur, KAN: Kanamicina, GEN: Gentamicina, ENR: Enrofloxacina, MAR: Marbofloxacino, PRA: Pradofloxacina, ERI: Eritromicina, CLI: Clindamicina, DOX: Doxiciclina, TCY: Tetraciclina, CHL: Cloranfenicol, SXT: Trimetoprima/Sulfametoxazol, NEO: Neomicina, CVN: Cefovecina.

Para el grupo de las bacterias Gram negativas, *E. coli* mostró mayor resistencia para ENR (35/35,100%), los aislamientos de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* de igual manera presentaron resistencia a ENR 87,5% (7/8) y 83,3% (5/6), respectivamente, las demás bacterias Gram negativas mostraron resistencia principalmente a Cefalotina (CEP, 41/74, 55,4%) (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Resistencia a antibióticos determinadas en cepas de bacterias Gram negativas aisladas de muestras de leche de vacas con mastitis clínica marzo-junio 2023, en fincas de lechería especializada de Costa Rica.

BACTERIA	CVN	ANTIBIOTICO																
		PG	TCY	DOX	AMC	ENR	CEP	AMP	EFT	NEO	GEN	PRA	CHL	CPD	NIT	SXT	AK	MAR
<i>E. coli</i> (n=35)	4	0	10	8	0	35	1	12	4	0	0	2	6	1	0	7	0	2
<i>K. pneumoniae</i> (n=8)	2	0	5	2	0	7	2	3	2	0	2	0	1	2	0	2	0	0
<i>P. aeruginosa</i> (n=6)	2	0	1	1	0	5	-	1	2	0	-	0	2	0	-	3	1	0
Otras bacterias Gram negativas (n=74)	11	1	39	32	31	40	41	20	9	6	3	1	10	23	10	7	0	0

Abreviaturas: CVN: Cefovecina, PG: Bencilpenicilina, TCY: Tetraciclina, DOX: Doxiciclina, AMC: Amoxicilina, ENR: Enrofloxacino, CEP: Cefalotina, AMP: Ampicilina, EFT: Ceftiofur, NEO: Neomicina, GEN: Gentamicina, PRA: Pradofloxacina, CHL: Cloranfenicol, CPD: Cefpodoxima, NIT: Nitrofurantoina, SXT: Trimetoprima/Sulfametoxazol, AK: Amikacina, MAR: Marfloxacino, -: ATB no analizado.

La información recopilada de la leche de tanque fue el recuento de células somáticas, que arrojó como resultado un promedio de 10,400 cs/cm<sup>3</sup>, el máximo de animales presentes en los hatos era de 80 animales.

## 5. Discusión

El presente trabajo investigó por primera vez la presencia de especies de *Mycoplasma* en muestras de leche de vacas con mastitis clínica, encontrándose solamente en una muestra de leche compuesta positiva *M. californicum*. Este representa el primer reporte del agente en leche de Costa Rica y Centroamérica, el cual ha sido asociado a mastitis bovina en

México (Infante-Martínez et al., 1999) y Argentina (Tamiozzo et al., 2014), siendo así el tercer hallazgo de esta bacteria en casos de mastitis de Latinoamérica.

No se encontró otra especie de *Mycoplasma* en la presente investigación, aunque recientemente se estableció la presencia de *M. californicum*, *M. bovigenitalium* y *M. canadense* en semen de toros reproductores de la zona atlántica del país (Varela-Amador et al., 2024), lo que supone un riesgo de infección para el ganado lechero. Aun así, la frecuencia de *Mycoplasma* en leche de animales con mastitis parece ser sumamente baja, así los resultados negativos de todas las muestras de leche de tanque analizadas concuerdan con lo reportado en Colombia por Velasco-Bolaños y colaboradores (2022), donde los micoplasmas no parecen ser actualmente agentes importantes en casos de mastitis. Los resultados coinciden además con reportes de Francia y Nueva Zelanda, donde se reportaron prevalencias menores al 1% (Arcangioli et al., 2011; McDonald et al., 2009).

Mediante el cultivo bacteriológico se logró identificar al grupo de los *S. no aureus* (47,6%) como agentes predominantes, a diferencia de los resultados obtenidos por Solano (2009) en Costa Rica, que encontró *S. no aureus* en un porcentaje mucho menor (10,8%). En un trabajo realizado en Ruanda (Ndahetuye et al., 2019) se utilizó espectrometría de masas de tiempo de vuelo con desorción por ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS), obteniendo resultados similares a los nuestros aislando *S. no aureus* en 40,2%. Estos resultados concuerdan además con los reportados por Vakkamäki y colaboradores (2017) en Finlandia, donde identificaron mediante técnicas moleculares un 43,3 % de *S. no aureus* en casos de mastitis. Estos agentes (*S. no aureus*) se aislaron en mayor cantidad en mastitis clínicas (47,0%) y subclínicas (28,0%) en Ecuador (Bonifaz et al., 2024).

El presente estudio contrasta además con el de Solano (2009) indicando que en Costa Rica las bacterias comunes del ámbito lechero siguen siendo los agentes aislados con más frecuencia en la leche mastítica, aunque los porcentajes de aislamientos de *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, y *S. aureus* en el presente trabajo fueron menores que los reportados en el 2009. A diferencia de países altamente industrializados como Estados Unidos de América y países europeos como Inglaterra donde se reporta *S. aureus* como el patógeno más frecuente en mastitis (Osterås et al., 1999) en nuestro estudio se aisló en menor frecuencia.

Las diferencias en los aislamientos bacterianos de 2009 en Costa Rica a los actuales pudieran deberse a la implementación de buenas medidas de higiene en los últimos años en los hatos ganaderos, siendo las medidas de salud e higiene en las personas encargadas del ordeño un pilar fundamental en la disminución de la propagación de estas bacterias (Bonifaz et al., 2024). En el caso de las bacterias Gram negativas *E. coli* es considerada uno de los patógenos causales de mastitis más comunes a nivel mundial en el ámbito lechero (Zaatout, 2022), sin embargo, nuestros resultados mostraron una baja prevalencia de esta bacteria en leche de vacas con mastitis en Costa Rica, resultados similares a lo reportado por Solano y colaboradores (2009).

El género *Streptococcus* se considera un género bacteriano emergente de importancia crítica en casos de mastitis (Diana et al., 2024), y fue el que presentó resistencia al grupo de las penicilinas, a diferencia con lo reportado en el 2009, donde mostraba una alta susceptibilidad (Solano., 2009). Esta diferencia podría deberse al uso inadecuado de antibióticos para el tratamiento de la mastitis. Por otro lado, *S. aureus* mostró una resistencia elevada para ENR, una fluoroquinolona de tercera generación desarrollado exclusivamente para uso veterinario (Idowu et al., 2010). Un total de 96,1% (50/52) aislamientos resultaron resistentes a este antibiótico, lo cual podría deberse a su uso desmedido en la industria ganadera para tratar enfermedades bacterianas respiratorias, gastrointestinales, y mastitis (Grabowski et al., 2022).

La resistencia a oxacilina encontrada para *S. aureus* (23,1%) fue mayor a la reportada por Solano (2009), y podría representar un problema para la salud pública, por el consumo de leche cruda con presencia de cepas de *S. aureus* Resistentes a Meticilina (SARM) (Horna et al., 2015). Sin embargo, no se realizó el análisis para confirmar si el gen *mecA* estaba presente en las cepas aisladas, por lo que no se puede asegurar de forma definitiva la circulación de SARM en leche de vacas con mastitis en Costa Rica. Aunque los *S. aureus* son consideradas menos agresivas que *S. aureus*, tienden a presentar mayor resistencia antimicrobiana, sobre todo por presencia de  $\beta$ -lactamasas (Taponen & Pyörälä, 2009), lo que concuerda con nuestros resultados. Además, se observó un porcentaje de resistencia más elevado a la oxacilina que lo reportado por Solano (2009) en este grupo bacteriano.

A diferencia de lo descrito por Solano (2009) donde el mayor porcentaje de resistencia a antibióticos para Gram negativos se presentó principalmente en el grupo de los

betalactámicos, en el presente estudio se encontró que *E. coli* presentó resistencia a los antibióticos principalmente para ENR (35/35, 100%), debido probablemente por el uso excesivo de este antibiótico, mientras que en países como Brasil, *E. coli* presentó mayor resistencia a tetraciclina (92,2%) y en China a kanamicina y ampicilina en un 87,1% para ambos antibióticos (Zaatout, 2022).

Este trabajo realza la importancia de realizar vigilancia continua en los aislamientos de agentes infecciosos en casos de mastitis y su perfil de sensibilidad, permitiendo evaluar de manera constante la resistencia antibiótica y la presencia de tratamientos refractarios. Esto facilita la selección de un adecuado tratamiento. Además, la vigilancia contribuye a establecer medidas de higiene y salud en los hatos ganaderos, reduciendo la propagación de bacterias contagiosas y ambientales, lo que favorece el bienestar en la salud animal. Aunque *Mycoplasma* presentó una baja frecuencia en casos de mastitis en Costa Rica, no debe descartarse como una causa de mastitis, ya que puede impactar tanto la salud del ganado como la producción lechera.

## 6. Conclusiones

- Se estableció una muy baja frecuencia de *Mycoplasma* spp. en muestras de leche de vacas con mastitis
- Se reporta por primera vez la presencia de *M. californicum* en una muestra de leche compuesta de vacas con mastitis en Costa Rica y Centro América.
- El grupo de los *S. no aureus* fueron las bacterias que se aislaron con mayor frecuencia en la leche de vacas con mastitis en Costa Rica.
- Enrofloxacin fue el antibiótico que presentó mayor resistencia a las bacterias aisladas de la leche de vacas con mastitis en Costa Rica.

## 7. Recomendaciones

- A pesar de la baja frecuencia de *Mycoplasma* en la leche de vacas con mastitis se debe de seguir investigando como agente causal, especialmente en casos de vacas con mastitis refractarias a tratamientos que han demostrado eficacia para casos similares en fincas.
- Confirmar la circulación de *S. aureus* resistentes a metilicina en leche de vacas con mastitis en Costa Rica.
- Mantener las medidas de higiene necesarias al momento de realizar el ordeño para evitar el contagio de un animal infectado a uno sano.

- Evitar el uso de antibióticos de manera inadecuada y sin previo análisis realizado por un médico veterinario, para evitar el mal uso de estos medicamentos y el aumento de la resistencia antibiótica.
- Continuar con los análisis de perfiles de resistencia antibiótica e implementar el análisis a nivel molecular en futuras investigaciones para identificar genes de resistencia.

## 8. Bibliografía

- Abebe, R., Hatiya, H., Abera, M., Megersa, B., & Asmare, K. (2016). Bovine mastitis: Prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 270. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0905-3>
- Andrade-Becerra, R. J., Caro-Carvajal, Z., Pulido-Medellín, M., & López-Cepeda, M. (2014). PREVALENCIA DE *Mycoplasma* spp., EN FINCAS LECHERAS DEL ALTIPLANO BOYACENSE (COLOMBIA). *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 17(2), 461–466.
- Andrade-Becerra, R. J., Caro-Carvajal, Z., Pulido-Medellin, M., & Lopez-Cepeda, M. (2014). Prevalencia de *Mycoplasma* spp. En fincas lecheras del altiplano Boyacense (Colombia). *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient*, 2(17), 461–466.
- Arcangioli, M., Chazel, M., Sellal, E., Botrel, M., Bézille, P., Poumarat, F., Calavas, D., & Le Grand, D. (2011). Prevalence of *Mycoplasma bovis* udder infection in dairy cattle: Preliminary field investigation in southeast France. *New Zealand Veterinary Journal*, 59(2), 75–78. <https://doi.org/10.1080/00480169.2011.552856>
- Ashraf, A., & Imran, M. (2020). Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis. *Animal Health Research Reviews*, 21(1), 36–49. <https://doi.org/10.1017/S1466252319000094>
- Behera, S., Rana, R., Gupta, P. K., Kumar, D., Sonal, Rekha, V., Arun, T. R., & Jena, D. (2018). Development of real-time PCR assay for the detection of *Mycoplasma bovis*. *Tropical Animal Health and Production*, 50(4), 875–882. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1510-1>
- Bonifaz, N., Galarza, X., Fuertes, B., Beltrán, J., Bonifaz, N., Galarza, X., Fuertes, B., & Beltrán, J. (2024). DETERMINACIÓN MOLECULAR DEL AGENTE ETIOLÓGICO DE LA MASTITIS BOVINA DE MUESTRAS PROVENIENTES DE UNIDADES PRODUCTORAS ANDINAS. *LA GRANJA*.

*Revista de Ciencias de la Vida*, 39(1), 139–149.  
<https://doi.org/10.17163/lgr.n39.2024.08>

Bradley, A. J. (2002). Bovine Mastitis: An Evolving Disease. *The Veterinary Journal*, 164(2), 116–128. <https://doi.org/10.1053/tvj.2002.0724>

Brees, RS · Brew, JD, El control de los suministros públicos de leche mediante el uso del método microscópico *J. Dairy Sci.* 1917; 1 :259-271

Bushnell, R. B. (1984). Mastitis por micoplasma. *Veterinary Clinics of North America: Large Animal Practice*, 6(2), 301–312. [https://doi.org/10.1016/S0196-9846\(17\)30024-1](https://doi.org/10.1016/S0196-9846(17)30024-1)

CLSI 2023. *Performance standards for Antimicrobial susceptibility Testing*. 33<sup>rd</sup> ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2023.

Diana, L., Mastroianni, L., Diana, V., & Puentes, R. (2024). Streptococcus spp. aislado de mastitis bovina: Estudios de sensibilidad antimicrobiana y evaluación de desacuerdo entre el diagnóstico fenotípico de rutina y la identificación molecular. *Revista Argentina de Microbiología*, 56(4), 351–358. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2024.07.006>

Dudek, K., Szacawa, E., & Nicholas, R. A. J. (2021). Recent Developments in Vaccines for Bovine Mycoplasmoses Caused by *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *Mycoides*. *Vaccines*, 9(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/vaccines9060549>

Fox, L. K. (2012). Mastitis por micoplasma: Causas, transmisión y control. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 28(2), 225–237. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2012.03.007>

Gelgie, A. E., Korsá, M. G., & Kerro Dego, O. (2022). *Mycoplasma bovis* Mastitis. *Current Research in Microbial Sciences*, 3, 100123. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100123>

Grabowski, Ł., Gaffke, L., Pierzynowska, K., Cyske, Z., Choszcz, M., Węgrzyn, G., & Węgrzyn, A. (2022). Enrofloxacin—The Ruthless Killer of Eukaryotic Cells or the Last Hope in the Fight against Bacterial Infections? *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), 3648. <https://doi.org/10.3390/ijms23073648>

Hale, H. H., Helmboldt, C. F., Plastringe, W. N., & Stula, E. F. (1962). Bovine mastitis caused by a *Mycoplasma* species. *The Cornell Veterinarian*, 52, 582–591.

- Horna, G., Astocondor, L., Jacobs, J., & García, C. (2015). [Phenotypic methods for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*]. *Revista Espanola De Quimioterapia: Publicacion Oficial De La Sociedad Espanola De Quimioterapia*, 28(2), 98–100.
- Hogeveen, H., Steeneveld, W., & Wolf, C. A. (2019). Production Diseases Reduce the Efficiency of Dairy Production: A Review of the Results, Methods, and Approaches Regarding the Economics of Mastitis. *Annual Review of Resource Economics*, 11(Volume 11, 2019), 289–312. <https://doi.org/10.1146/annurev-resource-100518-093954>
- Idowu, O. R., Peggins, J. O., Cullison, R., & Bredow, J. von. (2010). Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in lactating dairy cows and beef steers following intravenous administration of enrofloxacin. *Research in Veterinary Science*, 89(2), 230–235. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.12.019>
- Infante-Martínez, F., Aguado, J., & Eduard-Jasper, D. (1999). Mastitis outbreak due to *Mycoplasma californicum* and *Mycoplasma canadense* in a commercial dairy herd in the state of Jalisco, México. *Revista Latinoamericana De Microbiologia*, 41(3), 117–120.
- Kong, F., James, G., Gordon, S., Zelynski, A., & Gilbert, G. L. (2001). Species-Specific PCR for Identification of Common Contaminant Mollicutes in Cell Culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 3195–3200. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.3195-3200.2001>
- Kour, S., Sharma, N., N., B., Kumar, P., Soodan, J. S., dos Santos, M. V., & Son, Y.-O. (2023). Advances in Diagnostic Approaches and Therapeutic Management in Bovine Mastitis. *Veterinary Sciences*, 10(7), 449. <https://doi.org/10.3390/vetsci10070449>
- Matas Andreu, L., Molinos Abós, S., Fernández Rivas, G., González Soler, V., & Ausina Ruiz, V. (2006). Diagnóstico serológico de las infecciones por *Mycoplasma pneumoniae*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 24, 19–23. [https://doi.org/10.1016/S0210-5705\(09\)71003-9](https://doi.org/10.1016/S0210-5705(09)71003-9)
- McDonald, W., Rawdon, T., Fitzmaurice, J., Bolotovskii, I., Voges, H., Humphrey, S., Fernando, K., Canagasebey, Y., Thornton, R., & McIntyre, L. (2009). Survey of bulk tank milk in New Zealand for *Mycoplasma bovis*, using species-specific nested PCR and culture. *New Zealand Veterinary Journal*, 57(1), 44–49. <https://doi.org/10.1080/00480169.2009.36867>
- Ndahetuye, J. B., Persson, Y., Nyman, A.-K., Tukei, M., Ongol, M. P., & Båge, R. (2019). Aetiology and prevalence of subclinical mastitis in dairy herds in peri-

- urban areas of Kigali in Rwanda. *Tropical Animal Health and Production*, 51(7), 2037–2044. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01905-2>
- Nicholas, R. A. J., & Ayling, R. D. (2003). *Mycoplasma bovis*: Disease, diagnosis, and control. *Research in Veterinary Science*, 74(2), 105–112. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(02\)00155-8](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(02)00155-8)
- Nicholas, R. A. J., Fox, L. K., & Lysnyansky, I. (2016). *Mycoplasma mastitis* in cattle: To cull or not to cull. *The Veterinary Journal*, 216, 142–147. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.08.001>
- Osterås, O., Martin, S. W., & Edge, V. L. (1999). Possible risk factors associated with penicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical mastitis in early lactation. *Journal of Dairy Science*, 82(5), 927–938. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75311-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75311-7)
- Sawicka, A., Durkalec, M., Tomczyk, G., & Kurska, O. (2020). Occurrence of *Mycoplasma gallisepticum* in wild birds: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 15(4), e0231545. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231545>
- Sharun, K., Dhama, K., Tiwari, R., Gugjoo, M. B., Yattoo, M. I., Patel, S. K., Pathak, M., Karthik, K., Khurana, S. K., Singh, R., Puvvala, B., Amarpal, Singh, R., Singh, K. P., & Chaicumpa, W. (2021). Advances in therapeutic and managerial approaches of bovine mastitis: A comprehensive review. *The Veterinary Quarterly*, 41(1), 107. <https://doi.org/10.1080/01652176.2021.1882713>
- Solano, L., Rojas Gonzales, M., Murillo Herrera, J., & Barquero Calvo, E. (2009). Identificación de las bacterias causantes de mastitis y su patrón de sensibilidad a diferentes antibióticos, en vacas de hatos lecheros de Costa Rica asociados a la Cooperativa de Productores de Leche Dos Pinos R.L. Universidad Nacional Costa Rica.
- Sosa, C., Tirante, L., Chaves, J., Pol, M., Ambrogi, A., Giraudo, J. A., & Tamiozzo, P. (2018). Identificación de especies de *Mycoplasma* y de *Ureaplasma diversum* en rodeos lecheros de Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(1), 31–35. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.02.010>
- Suzuki, K., Kaneko, F., Matsushita, A., & Hata, E. (2024). Outbreaks of bovine mastitis caused by specific *Mycoplasma bovis* strains recurring at multi-year intervals. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 10406387241230939. <https://doi.org/10.1177/10406387241230939>
- Tamiozzo, P. J., Estanguet, A. A., Maito, J., Tirante, L., Pol, M., & Giraudo, J. A. (2014). Detection of *Mycoplasma canadense* and *Mycoplasma californicum* in dairy cattle

from Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(2), 119–121.  
[https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70059-8](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70059-8)

- Taponen, S., & Pyörälä, S. (2009). Los estafilococos coagulasa negativos como causa de mastitis bovina: ¿no son tan diferentes del *Staphylococcus aureus*? *Veterinary*
- Thomas, A. (2004). Conservation of the *uvrC* gene sequence in *Mycoplasma bovis* and its use in routine PCR diagnosis. *The Veterinary Journal*, 168(1), 100–102.  
[https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(03\)00186-2](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(03)00186-2)
- Vakkamäki, J., Taponen, S., Heikkilä, A.-M., & Pyörälä, S. (2017). Bacteriological etiology and treatment of mastitis in Finnish dairy herds. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 59(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s13028-017-0301-4>
- van Kuppeveld, F. J., Johansson, K. E., Galama, J. M., Kissing, J., Bölske, G., van der Logt, J. T., & Melchers, W. J. (1994). Detection of mycoplasma contamination in cell cultures by a mycoplasma group-specific PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(1), 149–152.
- Varela-Amador, J., Zuniga, M. J., Solorzano-Morales, A., & Dolz, G. (2024). *Mycoplasma* en animales domésticos y silvestres de Costa Rica. 1.
- Velasco-Bolaños, J., Jaramillo-Jaramillo, A. S., Villa-Arcila, N. A., Piepers, S., Dufour, S., & Ceballos-Márquez, A. (2022). Falta de evidencia para *Mycoplasma* spp. En leche de tanques de enfriamiento de hatos del centro-occidente colombiano. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 69(3), 268–280.  
<https://doi.org/10.15446/rfmvz.v69n3.103807>
- Volk, H., Piskernik, S., Kurincic, M., Klancnik, A., Toplak, N., & Jersek. (2014). Evaluation of different methods for DNA extraction from milk. *Journal of Food and Nutrition Research*, 53(2), 97–104.
- Watts, J. L. (1988). Etiological agents of bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 16(1), 41–66. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(88\)90126-5](https://doi.org/10.1016/0378-1135(88)90126-5)
- Zaatout, N. (2022). Una visión general de la *E. scherichia coli* asociada a la mastitis: Patogenicidad, inmunidad del huésped y uso de terapias alternativas. *Microbiological Research*, 256, 126960.  
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126960>

## Discusión general

La primera parte del trabajo investigó por primera vez la presencia de siete especies de *Mycoplasma* en animales silvestres y domésticos de Costa Rica y Centroamérica. En el grupo de animales domésticos se encontraron un 17,4% (53/305) de muestras positivas, el porcentaje de positividad reportado para hemoplasmas en gatos domésticos (3,1%) fue mucho menor que el reportado en los Estados Unidos (10,6%) (Levy et al., 2011, Marcondes et al., 2018) y en Brasil (8,9%) (Marcondes et al., 2018). En el 2023 Arguedas y colaboradores (2023) reportaron la presencia de “*Ca. M. haemominutum*” en gatos de Costa Rica, una especie diferente a la encontrada en la presente investigación. La especie de micoplasmas encontradas en gatos es hemotrópica, transmitidas principalmente por vectores biológicos como pulgas y garrapatas (Levy et al., 2011). Gatos adultos, sin raza definida, infestados con pulgas y garrapatas e infectados con el virus de la inmunodeficiencia felina son los que generalmente se encuentran infectados (Rosenqvist et al., 2016; Duarte et al., 2015).

Además, se reporta por primera vez el hallazgo de *M. hyorhinis* en cerdos con enfermedad respiratoria en Costa Rica (Lin et al., 2006). Este agente ha sido reportado como agente causal de la neumonía enzoótica porcina, además puede ocasionar poliseritis, artritis, y meningitis (Clavijo et al., 2017; Bünger et al., 2020). En México se ha reportado un alto porcentaje de positividad (51,8%) (Miranda Morales et al., 2020), comparado con países europeos como Alemania y Suiza (18,5% y 10,0%, respectivamente) (Luehrs et al., 2017). En estudios futuros se recomienda determinar la prevalencia de *M. hyorhinis* y la afectación en las piaras de Costa Rica, como también identificar la circulación de otras especies de micoplasma asociadas con enfermedades en porcinos como *M. hyopneumoniae* o *Mycoplasma suis* (hemoplasma).

En un 30,0% (21/70) de muestras de semen proveniente de toros utilizados como padrotes en hatos de carne se detectó por primera vez en Costa Rica y Centroamérica la presencia de *M. californicum*, *M. canadense* y *M. bovis genitalium*. *Mycoplasma canadense* y *M. californicum* han sido reportados presentes en EEUU (Gioia et al., 2021), en México (Infante-Martínez et al., 1999), y en Argentina (Tamiozzo et al., 2014) ocasionando mastitis, mientras que *M. bovis genitalium* tiene una mayor distribución en regiones de EEUU, África del Norte y Europa, ocasionando enfermedades respiratorias, artritis, neumonía, y mastitis en bovinos. En América Latina solo se había reportado hasta la fecha en Argentina (Sosa et al., 2018).

Estos micoplasmas ocasionan en bovinos machos infección del tracto urinario, ocasionando eventualmente una infección testicular que se podría manifestar con orquitis e infertilidad (Nicholas & Ayling, 2003). Como estas bacterias son de difícil diagnóstico y aislamiento, pueden pasar desapercibidas en hatos ganaderos y convertirse en agentes infecciosos desatendidos, por lo que se debe descartar la presencia de éstos al inseminar vacas o cruzarlas con un macho infectado (Hata et al., 2017). En tres (8,1%) de los 37 bovinos se encontraron coinfecciones, que no han sido reportadas anteriormente en otros estudios.

En la presente investigación, se utilizó inicialmente la amplificación del fragmento del gen ARNr 16S para la clase *Mollicutes* identificando además de *Mycoplasma*, ureaplasmas, sin embargo, se diseñaron y estandarizaron PCRs convencionales especie específico para las micoplasmas bovinas, esto con el fin de aumentar la sensibilidad en la identificación de las especies causales de enfermedades en bovinos, los cuales resultaron específicas y se recomiendan utilizar. En la presente investigación se detectó *U. diversum* en semen de un bovino, lo cual se ha reportado como causal de infertilidad, pérdida de peso y disminución de la calidad de leche en bovinos en Brasil, USA y Argentina, ocasionando importantes pérdidas económicas, por lo que se recomienda estudiar este agente en futuras investigaciones (Santos Junior et al., 2021, Sosa et al., 2018).

En seis (22,2%) de 27 hisopados bucales de monos de tres especies (mono cariblanco, mono tití y mono ardilla) se encontró la presencia de *M. salivarium*, una especie de bacteria causal de gingivitis en humanos y primates no humanos (David Engel & Kenny, 1970), aunque también se ha reportado en líquido sinovial de pacientes con artritis (Johnson et al., 2007). Los primates positivos eran animales que se encontraban en cautiverio en cuatro centros de rescate diferentes (Manuel Antonio, Cañas, Barra del Colorado y Alajuela), indicando una amplia distribución del agente en el país. Este es el primer reporte de esta especie de *Mycoplasma* en la cavidad oral de primates no humanos del Nuevo Mundo y concuerda con la especie reportada en Japón por Koshimizu y colaboradores (1975).

En uno (9,1%) de 11 mapaches (*Procyon lotor*) que residían en el Parque Nacional Manuel Antonio y alrededores se logró identificar la presencia de *M. haemocanis*, lo que coincide con reportes en EEUU (Volokhov et al., 2017), y en Brasil, en mapaches cangrejeros (*Procyon cancrivorus*) (Fagundes-Moreira et al., 2023). Esta especie de

*Mycoplasma* es causal de anemias que pueden ser de leves a crónicas en canidos, félidos y especies de vida silvestre, y es el primer reporte en mapaches de Costa Rica. Este hallazgo es de gran importancia, debido a que estos animales se logran adaptar con gran facilidad a entornos urbanos, y pueden pasar los patógenos a otros animales (como caninos) o al ser humano o viceversa (Bradley & Altizer, 2007; Volokhov et al., 2017). Se recomienda continuar con una búsqueda activa y mantener un constante monitoreo de micoplasmas en las poblaciones domésticas y silvestres de Costa Rica, para evitar el paso de patógenos entre estos grupos de animales, y evitar así la aparición de enfermedades emergentes (Dacak et al., 2021).

En la segunda parte del estudio se investigó por primera vez la presencia de especies de *Mycoplasma* en muestras de leche de vacas con mastitis clínica, encontrándose solamente en una muestra de leche compuesta positiva *M. californicum*. Este representa el primer reporte del agente en leche de Costa Rica y Centroamérica, el cual ha sido asociado a mastitis bovina en México (Infante-Martínez et al., 1999) y Argentina (Tamiozzo et al., 2014), siendo así el tercer hallazgo de esta bacteria en casos de mastitis de Latinoamérica.

No se encontró otra especie de *Mycoplasma* en la presente investigación, aunque recientemente se estableció la presencia de *M. californicum*, *M. bovis genitalium* y *M. canadense* en semen de toros reproductores de la zona atlántica del país (Varela-Amador et al., 2024), lo que supone un riesgo de infección para el ganado lechero. Aun así, la frecuencia de *Mycoplasma* en leche de animales con mastitis parece ser sumamente baja, así los resultados negativos de todas las muestras de leche de tanque analizadas concuerdan con lo reportado en Colombia por Velasco-Bolaños y colaboradores (2022), donde los micoplasmas no parecen ser actualmente agentes importantes en casos de mastitis. Los resultados coinciden además con reportes de Francia y Nueva Zelanda, donde se reportaron prevalencias menores al 1% (Arcangioli et al., 2011; McDonald et al., 2009).

Mediante el cultivo bacteriológico se logró identificar al grupo de los *S. no aureus* (47,6%) como agentes predominantes, a diferencia de los resultados obtenidos por Solano (2009) en Costa Rica, que encontró *S. no aureus* en un porcentaje mucho menor (10,8%). En un trabajo realizado en Ruanda (Ndahetuye et al., 2019) se utilizó espectrometría de masas de tiempo de vuelo con desorción por ionización láser asistida por matriz (MALDI-

TOF MS), obteniendo resultados similares a los nuestros aislando *S. no aureus* en 40,2%. Estos resultados concuerdan además con los reportados por Vakkamäki y colaboradores (2017) en Finlandia, donde identificaron mediante técnicas moleculares un 43,3 % de *S. no aureus* en casos de mastitis. Estos agentes (*S. no aureus*) se aislaron en mayor cantidad en mastitis clínicas (47,0%) y subclínicas (28,0%) en Ecuador (Bonifaz et al., 2024).

El presente estudio contrasta además con el de Solano (2009) indicando que en Costa Rica las bacterias comunes del ámbito lechero siguen siendo los agentes aislados con más frecuencia en la leche mastítica, aunque los porcentajes de aislamientos de *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, y *S. aureus* en el presente trabajo fueron menores que los reportados en el 2009. A diferencia de países altamente industrializados como Estados Unidos de América y países europeos como Inglaterra donde se reporta *S. aureus* como el patógeno más frecuente en mastitis (Osterås et al., 1999) en nuestro estudio se aisló en menor frecuencia.

Las diferencias en los aislamientos bacterianos de 2009 en Costa Rica a los actuales pudieran deberse a la implementación de buenas medidas de higiene en los últimos años en los hatos ganaderos, siendo las medidas de salud e higiene en las personas encargadas del ordeño un pilar fundamental en la disminución de la propagación de estas bacterias (Bonifaz et al., 2024). En el caso de las bacterias Gram negativas *E. coli* es considerada uno de los patógenos causales de mastitis más comunes a nivel mundial en el ámbito lechero (Zaatout, 2022), sin embargo, nuestros resultados mostraron una baja prevalencia de esta bacteria en leche de vacas con mastitis en Costa Rica, resultados similares a lo reportado por Solano y colaboradores (2009).

El género *Streptococcus* se considera un género bacteriano emergente de importancia crítica en casos de mastitis (Diana et al., 2024), y fue el que presentó resistencia al grupo de las penicilinas, a diferencia con lo reportado en el 2009, donde mostraba una alta susceptibilidad (Solano., 2009). Esta diferencia podría deberse al uso inadecuado de antibióticos para el tratamiento de la mastitis. Por otro lado, *S. aureus* mostró una resistencia elevada para ENR, una fluoroquinolona de tercera generación desarrollado exclusivamente para uso veterinario (Idowu et al., 2010). Un total de 96,1% (50/52) aislamientos resultaron resistentes a este antibiótico, lo cual podría deberse a su uso desmedido en la industria ganadera para tratar enfermedades bacterianas respiratorias, gastrointestinales, y mastitis (Grabowski et al., 2022).

La resistencia a oxacilina encontrada para *S. aureus* (23,1%) fue mayor a la reportada por Solano (2009), y podría representar un problema para la salud pública, por el consumo de leche cruda con presencia de cepas de *S. aureus* Resistentes a Meticilina (SARM) (Horna et al., 2015). Sin embargo, no se realizó el análisis para confirmar si el gen *mecA* estaba presente en las cepas aisladas, por lo que no se puede asegurar de forma definitiva la circulación de SARM en leche de vacas con mastitis en Costa Rica. Aunque los *S. aureus* son consideradas menos agresivas que *S. aureus*, tienden a presentar mayor resistencia antimicrobiana, sobre todo por presencia de  $\beta$ -lactamasas (Taponen & Pyörälä, 2009), lo que concuerda con nuestros resultados. Además, se observó un porcentaje de resistencia más elevado a la oxacilina que lo reportado por Solano (2009) en este grupo bacteriano.

A diferencia de lo descrito por Solano (2009) donde el mayor porcentaje de resistencia a antibióticos para Gram negativos se presentó principalmente en el grupo de los betalactámicos, en el presente estudio se encontró que *E. coli* presentó resistencia a los antibióticos principalmente para ENR (35/35, 100%), debido probablemente por el uso excesivo de este antibiótico, mientras que en países como Brasil, *E. coli* presentó mayor resistencia a tetraciclina (92,2%) y en China a kanamicina y ampicilina en un 87,1% para ambos antibióticos (Zaatout, 2022).

Este trabajo realza la importancia de realizar vigilancia continua en los aislamientos de agentes infecciosos en casos de mastitis y su perfil de sensibilidad, permitiendo evaluar de manera constante la resistencia antibiótica y la presencia de tratamientos refractarios. Esto facilita la selección de un adecuado tratamiento. Además, la vigilancia contribuye a establecer medidas de higiene y salud en los hatos ganaderos, reduciendo la propagación de bacterias contagiosas y ambientales, lo que favorece el bienestar en la salud animal. Aunque *Mycoplasma* presentó una baja frecuencia en casos de mastitis en Costa Rica, no debe descartarse como una causa de mastitis, ya que puede impactar tanto la salud del ganado como la producción lechera.

### **Conclusiones generales**

- Se reporta por primera vez en Costa Rica y Centroamérica la presencia de siete especies de *Mycoplasma* en mucosa y sangre animales silvestres y domésticos.
- Se reporta por primera vez la presencia de *M. salivarium*, agente causal de la gingivitis en primates no humanos (mono cariblanco, mono tití y mono ardilla) de Costa Rica.

- Se reporta por primera vez la presencia de *M. hyorhinitis*, agente causal de la neumonía enzoótica en piaras de cerdos de Costa Rica.
- Se reporta por primera vez la presencia de *Ca. M. turicensis*, representando así la segunda especie de micoplasma hemotrópica encontrada en gatos domésticos de Costa Rica
- Se reporta por primera vez la presencia de *M. haemocanis* en mapaches (*Procyon lotor*) de Costa Rica.
- Se reporta por primera vez la presencia de *M. canadense*, *M. californicum* y *M. bovis genitalium* en semen de toros de Costa Rica.
- Se estableció una muy baja frecuencia de *Mycoplasma* spp. en muestras de leche de vacas con mastitis
- Se reporta por primera vez la presencia de *M. californicum* en una muestra de leche compuesta de vacas con mastitis en Costa Rica y Centro América.
- El grupo de los *S. no aureus* fueron las bacterias que se aislaron con mayor frecuencia en la leche de vacas con mastitis en Costa Rica.
- Enrofloxacin fue el antibiótico que presentó mayor resistencia a las bacterias aisladas de la leche de vacas con mastitis en Costa Rica.

### **Recomendaciones generales**

- Continuar con una búsqueda activa y mantener un constante monitoreo de micoplasmas en las poblaciones domésticas y silvestres de Costa Rica.
- Controlar en granjas porcinas la presencia de *M. hyorhinitis*, y otras especies de micoplasmas para prevenir pérdidas económicas por enfermedad.
- Estudiar especies de micoplasmas en bovinos y su asociación con enfermedades reproductivas, mastitis, y artritis en diferentes hatos ganaderos nacionales.
- A pesar de la baja frecuencia de *Mycoplasma* en la leche de vacas con mastitis se debe de seguir investigando como agente causal, especialmente en casos de vacas con mastitis refractarias a tratamientos que han demostrado eficacia para casos similares en fincas.
- Confirmar la circulación de *S. aureus* resistentes a meticilina en leche de vacas con mastitis en Costa Rica.
- Mantener las medidas de higiene necesarias al momento de realizar el ordeño para evitar el contagio de un animal infectado a uno sano.

- Evitar el uso de antibióticos de manera inadecuada y sin previo análisis realizado por un médico veterinario, para evitar el mal uso de estos medicamentos y el aumento de la resistencia antibiótica.
- Continuar con los análisis de perfiles de resistencia antibiótica e implementar el análisis a nivel molecular en futuras investigaciones para identificar genes de resistencia.

## Anexos

### Muestras secuenciadas

#### Muestras felinas

##### >8F\_MG-R 242pb *Mycoplasma turicensis*

TTTGCAGAGGATGTCAAACCTTGGTAAGGTTTTTCGTGTATTATCGAATTAAG  
CAACATGTTCCACCACTTGTTTCAGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCATATT  
TGCATATGTACTACCCAGGCGGGGTATTTAACACGTAAGCTACAACGCCGAA  
ACTCAAGTCCCGACATCTAATACCCATCGTTTACGGTGTGGACTACTGGGGTA  
TCTAATCCCATTGCTACCCACACTTTCAA

##### >16F *Mycoplasma turicensis*

GTGACAGCAAACCTATGTGCCAGCAGCTGCGGTAATACATAGGTCGCGAGCGT  
TATTCGGATTTATTGGGCGTAAAGCAAGCGCAGGGCGGATGAATAAGTTCTGC  
ATTAAAAGCAGCTGCTTAACAGTTGTTTGTGCCGAATACTATTCATCTAGAAT  
GTGGTAGAAAGTTTTGGAATTAATATGGAGCGGTGGAATGTGTAGATATATT  
TAAGAACACCAGAGGCGAAGGCGAAAACCTTAGGCCATTATTGACG

##### >43F\_MG-R 242pb *Mycoplasma turicensis*

TTTGCAGAGGATGTCAAACCTTGGTAAGGTTTTTCGTGTATTATCGAATTAAG  
CAACATGTTCCACCACTTGTTTCAGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCATATT  
TGCATATGTACTACCCAGGCGGGGTATTTAACACGTAAGCTACAACGCCGAA  
ACTCAAGTCCCGACATCTAATACCCATCGTTTACGGTGTGGACTACTGGGGTA  
TCTAATCCCATTGCTACCCACACTTTCAA

##### >98F\_MG-R 202 pb *Mycoplasma turicensis*

AGGAGGTCAAACCTTGGTAAGGTTTTTCGTGTATTATCGAATTAAGCAACATG  
TTCCACCACTTGTTTCAGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCATATTTGCATAT  
GTACTACCCAGGCGGGGTATTTAACACGTAAGCTACAACGCCGAAACTCAAG  
TCCCGACATCTAATACCCATCGTTTGCGGTGTGGACTACTGGG

##### >153F\_MG-R 235 pb *Mycoplasma turicensis*

AGGAGGTCAAACCTTGGTAAGGTTTTTCGTGTATTATCGAATTAAGCAACATG  
TTCCACCACTTGTTTCAGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCATATTTGCATAT  
GTACTACCCAGGCGGGGTATTTAACACGTAAGCTACAACGCCGAAACTCAAG  
TCCCGACATCTAATACCCATCGTTTGCGGTGTGGACTACTGGGGTATCTAATC  
CCATTTGCTACCCACACTTTCAA

## Muestras de hisopados de monos

### >HM130 *Mycoplasma salivarium*

GAGCGACACAGCGTGCACGATGAAGGTCTTATGGATTGTAAAGTGCTGTTGC  
AAGGGAAAGAAAAAGTAGTTGAGGAAATGCTTCTACATTGACGGTACCTTGT  
TAGAAAGCGATGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGTCGC  
AAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTTCGTAGGCTGTTTATTAAGT  
CTGGAGTCAAATCCCAGGGCTCAACCCTGGCTCGCTTT

### >HM138\_MG-R 316pb *Mycoplasma salivarium*

GCAGCCC GCGGTAATACATAGGTCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTA  
AAGCGTTCGTAGGCTGTTTATTAAGTCTGGAGTCAAATCCCAGGGCTCAACC  
CTGGCTCGCTTTGGATACTGGTAACTAGAGTTGGATAGAGGTAAGCGGAAT  
TCCATGTGAAGCGGTGAAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAAGGCGA  
AGGCAGCTTACTGGGTTTATACTGACGCTG

### >HM142 *Mycoplasma salivarium*

GAAATGCTTCTACATTGACGGTACCTTGTAGAAAGCGATGGCTAACTATGT  
GCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGTCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGC  
GTAAAGCGTTCGTAGGCTGTTTATTAAGTCTGGAGTCAAATCCCAGGGCTCA  
ACCCTGGCTCGCTTTGGATACTGGTAACTAGAGTTGGATAGAGGTAAGCGG  
AATCCATGTGAAGCGGTGAA

### >HM144\_MG-R *Mycoplasma salivarium*

TCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTTGGTCAAGTCCTGCAACGAGCGCAACC  
CCTATCTTTAGTTACTAACGAGTCATGTGCGAGGACTCTAGAGATACTGCCTGG  
GTAAGTGGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCTCTTACGAGT  
GGGGCAACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAAAGAGAAGCAATATGGTGA  
CATGGAGCAAATCTCAAAA

### >HM147 *Mycoplasma salivarium*

GGAGTCAAATCCCAGGGCTCAACCCTGGCTCGCTTTGGATACTGGTAACTA  
GAGTTGGATAGAGGTAAGCGGAATTCCATGTGAAGCGGTGAAAATGCGTAGA  
TATATGGAAGAACACCAAAGGCGAAGGCAGCTTACTGGGTTTATACTGACGC  
TGAGGAACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA  
CGCCGTAAACGATGATCATTAGTCGGCAGAGAA

### >HM149 *Mycoplasma salivarium*

GGGTAAGTGGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCTCTTACGA  
GTGGGGCAACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAAAGAGAAGCAATATGGC  
GACATGGAGCAAATCTCAAAAAGCCGATCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAA  
TTCGACTTCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCTATGCTGCGG  
TGAATACGTTCTCGGGTCTTGTACACACCGC

## Muestras de cerdos

### >P1\_MG-R 201pb *Mycoplasma hyorhinis*

CAAAGCTTTGAATTTGAAGACAAAAAAATTAGATTACATAATTTCAAAC  
CACTTTTAAAGACAATTGAGAAAGATTTGATAATTTCTTCAATTTCAAACAAG  
GTTGTTTACACGAAATTGATTAATTAAGTTATTTTAAATAAATTTACAAAAA

ATATTTTATTAATAAACCTAAAGAAAAAGCTTCTTTTTGCTTCTTCTTTAGGTT  
TTTTCAATACACAAATGTGGTAA

**>P2\_MG-R 230pb *Mycoplasma hyorhinis***

AAATAATTTATTTAAATTTGTAGCAATTGCGATTTTCTTATTTTCTTGAGTAAGT  
AGAGTTGTAGTTTTAGAAAGTTATGATTATATTTACAAATGAGAATACTTACCG  
CTGCATTTGTGTAGGTTGATGATGGTGGTTGTAGTTGTGGTTTTATTCTTTAAT  
AAAATTGAGTATATTCGCTTTTTTTGTTATTTCCTTCATTTTLAGGTGCATTTTLAG  
CTCTATTATTTGCTGATATTTCAAGAATA

**>P3\_MG-R 310pb *Mycoplasma hyorhinis***

AGAGTGGGTAAGGTTCTACGCGTAGCATCAAATTAACCACATGCTCCACCG  
CTTGTCGGGTTCCCGTCAATTCCTTTAAGTTTCACTCTTGCGAGCATACTAC  
TCAGGCGGATCATTTAACGCGTTAGCTGCGTTAGTGAAATTATTCCACCAACT  
AATGATCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCC  
CCACGCTTTCGTCCCTTAGTGTAATATAACCAGTTAGCTGCCTTCGCCTAT  
TGGTGTCTTCCATAATATCTACGCATTCCACCGCTTCACTAGGAA

**Muestras Bovinos**

**>Bovino10\_ *McalifornicumF***

GTCTGATGGAGCGACACAGCCGTGCAGGATGAAGGCCCTATGGGTTGTAAAC  
TGCTGTGGTAAGGGAATAAAAAACAGTGTAGGAAATGCCACTGTATTGAATG  
TACCTTATTAGAAAGCAACGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAT  
AGGTTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCTGTAGGTTGTTT  
GTTAAGTCTGGCGTTAAATTTGGGGCTCAACCCCAAACCGCGTTGGATACT  
GGCAAAGTAGAGTTATGTAGAGGTTAGCGGAATTCCTTGTGAAGCGGTGAAA  
TGCGTAGATATAAGGAAGAACAACCAACATGGCGAAGGCAGCTAACTGGACAT  
ATACTGACACTGAGAGACGAAAGCGTGGGGAGCAAAC

**>Bovino67 *Mycoplasma canadense***

GACTAATGATCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTT  
CTCCCCACGCTTTCGTCCCTCAGCGTCAGTATAGACCCAGTAAGCTGCCTTCG  
CCTTTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTTACCGCTTCCATGGAATTCCG  
CTTACCTCTATCTAACTCTAGTTTACCAGTATCCAAAGCGAGCCAGGGTTGAG  
CCCTGGTATTTGACTCCAGACTTAATAAACAGCCTACGAACGCTTTACGCCA  
ATAATCCGGATAACGCTTTCGACCTATGTATTACCGCGGCTGCTGGCACATA  
GTTAGCCATCGCTTTCGTGACAGGGTACCGTCAGCTTGGAAAGCATTTCCTCAAC  
CAAGTGTCTTTCCCTATAACAGCACTTTACAATCAGAAGACCTTCATCGTGC  
ACGCTGTGTCGCTCCATCAAGCTTTCGCTCATTGTGG

**>Bovino55\_ *ureaplasma\_ diversum***

CGATGAAGGTCTATAAGATTGTAAAGTTCTTTTATTTGGGAAGAACCACTAAA  
ATAGGAAATGATTTTAGCTTACTGTACCATTTGAATAAGTATCGGCTAACTAT  
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGATGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGG  
GCGTAAAACGAGCGCAGGCGGATTTGTAAAGTTAGGTATGAAATCTAGATGC  
TTAACGTCTAGCTGTATCAAAAACACTACGAATCTAGAGTGTAGCAGAGAGTTG  
GGAACTCCATGTGGAGCGGTAATGCGTAGATATATGGAAAGAACACCGG  
TGGCGAAGGCACCCAACTTGGACTATTACTGACGCTTAGGCTCGAAAGTGTG  
GGGAGCAAATAGGATTAGATACCCCTAGCAGCCACACCCGTAAACGATCAT

CATTAATGGCGGATCGCTTATGAGTCATGTGTTGTAGCTAACGCATTAATG  
ATGTGCCTGGGTAGTACATTTCGCAAGAATGAAACTCAAACGGAATTGACGGG  
GACCCGCACAAGTGGTGGAGCATGTTGCTTAATTTGACAATACACGTAGAAC  
CT

>**Bovino5\_ *Mbovigenitalium***

ACAGCGTGCAGGATGAAGGCCCTATGGGTTGTAAACTGCTGTGGTANGGGAA  
TAAAAAATAGTGTAGGAAATGCCACTATATTGAATGTACCTTATTAGAAAGCA  
ACGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGTTGCAAGCGTTATC  
CGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCTGTAGGTTGTTTGTAAAGTCTGGCGTTAA  
ATTTTGGGGCTCAACCCCAAACCGCGTTGGATACTGGCAAACCTAGAGTTATG  
TAGAGGGTTAGCGGAATTCCTTGTGAAGCGGTGAAATGCGTAGATATAAGGA  
AGAACACCAACATGGCGAAGGCAGCTAACTGGACATACTTCACTGAGAG  
ACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTA  
AACGTTGATCATTAGCTGATGGGGAACCTCATCGGCGCAGCTAACGCATT

**Muestras Mapache**

>**Mapache-*Mycoplama haemocanis***

CATGTGAACGATGAAGGCCTTTTTGGTTGTAAAGTTCTTTTACGAGGGATAAT  
TATGATAGTACTTCGTGAATAAGTGACAGCAAACCTATGTGCCAGCAGCTGCCG  
TAATACATAGGTCGCAAGCATTATTCGGATTTATTGGGCGTAAAGCAAGCGCA  
GGCGGATGTGTAAGTTCTGTGTTAAATGCAGCTACTCAATAGTTGTATGCACC  
GAATACTACATGTCTAGATTGTGGTAGGGAGTTTCGGAATTAAGCATGGAGCG  
GTGGAATGTGTAGATATGCTTAAGAACCAGAGGCGAAGGCGGAAACTTAG  
GCCATAAATGACGCTTAGGCTTAAAGTGTGGGGAGCAAATGGGATTAGATA  
CCCCAGTAGTCCACACCGTAAACGATGGGGTATTAGATATTAGGGCTTTAGCT  
TTAGTGTGTAGCTTACGCGTTAAATACCCCGCCTGGGGTAGTACATATGCAA  
ATATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGACCTGAAACAAGTGGTGGAGCATG  
TTGCTTAATTCGATAATACA

>**MUESTRA\_POOL13LECHE\_ *M. californicum* (322/324) 99,38%**

CTAATTGATACAACACCTTTATTACCGTGACGTCCACTCATTTTATCGCCCACT  
TTAATTTTACGTTTAAACAGCAATTGATACCTTTACAATTTTGTCAATACCATCTT  
CAAGAGCATCTTTGTTTTGGCGATCTAAAATTTCAACACCAATGATAGTACCG  
CCATGACCATTTTAACTTTTAAATGATGTATCTTTTACAGGGTGTGTCTTTGTT  
GTAAAACGGCAAGCAATAATTTTCTCTTTCGATGGATTATCATCACCTTTG  
GGACTTACACGACCAACTAAAACATCGCCTGGAACCACATCCTGAACCAACA  
CGTAGCA