Comunicaciones breves

Detección molecular de *Mycoplasma spp.* en gatos con y sin signos clínicos compatibles con Complejo Respiratorio Felino

Ab Intus
REVISTA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA - UNRC

Molecular detection of *Mycoplasma spp.* in cats with and without Feline Respiratory Disease Complex-compatible clinical signs

Cecilia Hurras
Veterinaria Mi Mascota, Argentina

Belén Mora
ACERCA Laboratorio, Las higueras, Córdoba, Argentina

Pablo González
Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina

Pablo Tamiozzo
Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina
ptamiozzo@ayv.unrc.edu.ar

Ab intus FAV-UNRC
vol. 7, núm. 13, 2024
Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina
ISSN-E: 2618-2734
Periodicidad: Semestral
abintus@ayv.unrc.edu.ar

Recepción: 20 Septiembre 2023
Aprobación: 15 Abril 2024

DOI: https://doi.org/10.5281/zenodo.13136485

URL: https://portal.amelica.org/ameli/journal/820/8205059004/

Resumen: El complejo respiratorio felino (CRF) es una enfermedad distribuida mundialmente y común en lugares donde hay una alta concentración de gatos. Los agentes comúnmente asociados al CRF son *Herpesvirus felino, Calicivirus felino, Chlamydophila felis, Bordetella bronchiseptica* y *Mycoplasma* spp., aunque el papel de éstos últimos es controvertido ya que puede encontrarse en animales sanos o enfermos. En la región no hay muchos antecedentes de su detección en gatos. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue detectar *Mycoplasma* spp. en gatos con y sin sintomatología clínica compatible con CRF mediante el uso de PCR. Se realizó un estudio transversal colectando muestras (hisopado ocular, nasal y bucal) de 19 gatos con y sin sintomatología. Las muestras fueron analizadas por una PCR para la detección de *Mycoplasma* spp. y las muestras positivas fueron analizadas por una PCR especie específica de *M. felis*. Cinco gatos (5/19- 26% -IC 95% 9,1-51,2) fueron positivos a la PCR para la detección de *Mycoplasma* spp. y de ellos, solamente uno (1/19-5% -IC 95% 0,1-26) resultó positivo a la PCR especifica de *M. felis*. Se concluyó que *Mycoplasma* spp y *M. felis* están presentes en gatos con y sin sintomatología compatible con CRF.

Palabras clave: Gatos, complejo respiratorio felino, *Mycoplasma* sp., *Mycoplasma felis*, PCR.

Abstract: Feline respiratory disease complex (FRDC) is a globally distributed disease common in places where there is a high concentration of cats. Agents commonly associated with FRDC are feline Herpesvirus, feline Calicivirus, *Chlamydophila felis, Bordetella bronchiseptica* and *Mycoplasma felis*, although the role of the latter is controversial as it can be found in healthy or unhealthy animals. In the region, there is a lack of records about its detection in cats. Therefore, the aim of this study was to detect *M. felis* in cats with and without

Notas de autor

ptamiozzo@ayv.unrc.edu.ar

Modelo de publicación sin fines de lucro para conservar la naturaleza académica y abierta de la comunicación científica
PDF generado a partir de XML-JATS4R

clinical symptoms compatible with FRDC using PCR. A cross-sectional study was performed collecting specimens (ocular, nasal and buccal swabs) from 19 cats with and without symptomatology. Specimens were first tested by PCR for *Mycoplasma* sp., considered as screening test, and positive specimens were tested by a species-specific PCR for *M. felis*. Five cats (5/19- 26% - CI 95% 9.1-51.2) were PCR positive for *Mycoplasma* sp. and of these, only one (1/19-5%- CI 95% 0.1-26) was positive for *M. felis* species-specific PCR. It was concluded that *M. felis* and possibly other *Mycoplasmas* species were detected in healthy and unhealthy cats.

Keywords: Cats, Feline respiratory disease complex, *Mycoplasma* sp., *Mycoplasma felis*, PCR.

Modelo de publicación sin fines de lucro para conservar la naturaleza académica y abierta de la comunicación científica
PDF generado a partir de XML-JATS4R

Los agentes etiológicos más prevalentes asociados al complejo respiratorio felino (CRF) son: *Herpesvirus felino* (HVF-1), *Calicivirus felino* (CVF), *Chlamydophila felis*, *Bordetella bronchiseptica* y *Mycoplasma spp*. (Litster *et al.*, 2015). Las co-infecciones y las infecciones bacterianas secundarias son habituales (Fernandez *et al.*, 2017, Nguyen *et al.*, 2019). Los gatos afectados por CRF pueden presentar una variada signología que comprende rinitis, conjuntivitis, queratitis, úlceras corneales, fiebre, estomatitis, gingivitis, hipersalivación, úlceras en piel de la zona nasal (Cohn, 2011) y por lo general, no se arriba a un diagnóstico etiológico de certeza. De los agentes involucrados en el CRF, *Mycoplasma spp*. es el más controvertido. Su rol como agente primario de CRF es discutido, aunque se cree que contribuye como agente secundario, además de encontrarse en gatos sanos (Lee-Fowler, 2014; Fernández *et al*., 2017). En animales con CRF, su presencia ha sido asociada con conjuntivitis, gingivoestomatitis y enfermedad de las vías respiratorias altas, principalmente. También se lo ha involucrado como agente responsable de enfermedades del tracto respiratorio inferior y de la cavidad pleural como patógeno primario y ocasionalmente se ha documentado como causa de absceso pulmonar y piotórax. (Lee-Fowler, 2014). El diagnóstico de *Mycoplasma spp*. puede realizarse mediante aislamiento y crecimiento bacteriano a partir de muestras clínicas o técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), pero debido a la dificultad en el aislamiento, la PCR es una técnica de elección para su identificación (Chalker *et al.*, 2004). Si bien *Mycoplasma felis* (*M. felis*) es la especie de micoplasma más frecuentemente asociada a gatos domésticos con CRF, otras especies como *Mycoplasma gateae* (*M. gateae*), *Mycoplasma feliminutum* (*M. feliminutum*), *Mycoplasma arginini* (*M. arginini*), *Mycoplasma pulmonis* (*M. pulmonis*), *Mycoplasma arthritidis* (*M. arthritidis*) y *Mycoplasma gallisepticum* (*M. gallisepticum*) también se han asociado con CRF (Greene y Chalker, 2012, Lee-Fowler, 2014). En Argentina existen escasos antecedentes en la literatura acerca de la detección de micoplasmas en gatos enfermos y sanos. Copes *et al.*, en 1997 aislaron *Mycoplasma spp* en seis de ocho gatos, identificando solamente *M. felis*. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue detectar *Mycoplasma spp*. en gatos con y sin sintomatología clínica compatible con CRF utilizando PCR.

Se realizó un estudio transversal en una veterinaria de la ciudad de Río Cuarto (Veterinaria Mi Mascota). En total, fueron muestreados 19 gatos (de diferentes edades, machos y hembras, castrados y no castrados, criados adentro o afuera). De los gatos muestreados, 14 tenían signología clínica compatible con CRF (secreción nasal, conjuntivitis y/o sialorrea) y cinco no presentaban sintomatología compatible con CRF. No se registró si estaban vacunados o no contra el CRF. El n de animales muestreados fue establecido para determinar presencia o ausencia (detección de al menos un positivo) estimando una prevalencia del 15% con un 95% nivel de confianza). De cada gato se colectaron muestras de hisopado nasal, conjuntival y bucal con distintos hisopos estériles de dacrón (Deltalab, España). Las muestras fueron refrigeradas a 4oC hasta su arribo al laboratorio. Una vez en el laboratorio, las muestras fueron procesadas del siguiente modo: Por cada animal, se armó un pool de cada uno de los tres hisopos colectados (nasal, conjuntival y bucal). El ADN del pool fue extraído con kit comercial (PuriPrep-S®, Inbiohighway, Argentina) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la detección de *Mycoplasma spp*., se realizó una PCR anidada utilizando los cebadores y las condiciones descriptas por los autores (Tang *et al*., 2000). Brevemente, la primera reacción se realizó en un volumen total de 50 µl (45µl de mezcla y 5 µl de ADN templado) conteniendo 1 X de buffer, 50 mM de cada dNTP, 20 pmol de cada cebador externo, 1,25 de Cl2Mg y 1 U de Taq ADN polimerasa (Inbiohighway®, Argentina). El programa de ciclado fue una desnaturalización inicial de 94oC por 30 seg. seguido de 30 ciclos de: desnaturalización a 94oC por 30 seg, annealing a 55oC por 2 min, y extensión a 72oC por 2 min. Con una extensión final de 72oC por 5 min. La segunda reacción se realizó con 1 µl del producto de la primera en 49 µl de mezcla, con los cebadores de la segunda reacción, y la misma mezcla que la anteriormente descripta. Posteriormente y con el fin de identificar la especie de micoplasma más frecuentemente asociada a gatos con

CRF, las muestras que resultaron positivas a la PCR antes mencionada, fueron procesadas por una PCR especie específica para *M. felis*, utilizando los cebadores y las condiciones descriptas por los autores (Chalker *et al.*, 2004), utilizando como control positivo ADN de la colección del Laboratorio de Patología Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto. Brevemente, la PCR se realizó en un volumen final de 50 µl (10 µl de ADN templado y 40 µl de mezcla) incluyendo 5X de buffer, 1,5 mM Cl2Mg, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 U de Taq polimerasa (Inbiohighway®, Argentina) y 25pmol de cada cebador bajo las siguientes condiciones de ciclado: Desnaturalización inicial de 95oC por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 95oC por 45 seg, annealing a 51oC por 30 seg y extensión a 72oC por 20 seg, seguido por una extensión final a 72oC por 5 min. Los productos de PCR fueron visualizados en gel de agarosa al 1,5% teñidos con SYBR Green I® (Thermofischer, Argentina). No se identificó la especie de ningún otro micoplasma.

Cinco gatos resultaron positivos a la PCR para la detección de *Mycoplasma spp*. (5/19- 26% - IC 95% 9,1-51,2-) y de ellos, solamente uno (1/19-5% - IC 95% 0,1-26) resultó positivo a la PCR específica de *M. felis*. De los cinco gatos positivos a la PCR tamiz, cuatro presentaron algún tipo de secreción, y solo uno no presentó ninguna. El gato positivo a *M. felis* era un animal de un mes de edad, con los tres tipos de secreciones (Tabla 1).

Modelo de publicación sin fines de lucro para conservar la naturaleza académica y abierta de la comunicación científica
PDF generado a partir de XML-JATS4R

Tabla 1
Resultados de la PCR para la detección de *Mycoplasma spp.* y *Mycoplasma felis* de los gatos muestreados de acuerdo a la edad

Identificación del paciente	Edad	Crianza	Castrado	Sexo	Descarga Nasal	Descarga Ocular	Sialorrea	PCR	
								Mycopalsma spp	M. felis
1	6 M	O	NO	H	SI	SI	NO	-	-
2	ND	O	SI	M	SI	SI	SI	-	-
3	2M	I	NO	H	SI	SI	NO	-	-
4	3A	O	SI	H	SI	SI	SI	+	-
5	5A	O	SI	M	NO	NO	NO	-	-
6	ND	O	NO	M	SI	NO	SI	-	-
7	3A	O	SI	M	SI	NO	SI	-	-
8	7A	I	SI	H	NO	NO	NO	-	-
9	3A	I	SI	H	NO	NO	NO	+	-
10	1M	I	NO	M	SI	SI	SI	+	+
11	2M	O	NO	M	NO	SI	NO	+	-
12	6M	I	NO	M	SI	SI	NO	+	-
13	4M	O	NO	M	NO	NO	SI	-	-
14	2M	O	NO	H	SI	SI	NO	-	-
15	5M	O	NO	M	SI	SI	SI	-	-
16	1A	O	NO	H	SI	SI	NO	-	-
17	2M	O	NO	M	NO	NO	NO	-	-
18	7M	O	NO	H	NO	NO	NO	-	-
19	2A	O	NO	M	NO	SI	SI	-	-

(M: Meses, A: Años), crianza (Outdoor/Indoor), castrados (SI/NO), sexo (M: macho, H: hembra) y la presentación de descarga nasal (SI/NO), descarga ocular (SI/NO), sialorrea (SI/NO). ND: No disponible

El objetivo planteado en el presente trabajo fue alcanzado, ya que logró detectarse Mycoplasma spp. en cinco gatos, identificando, además, en uno de ellos a *M. felis*. El hecho de que, de las cinco muestras positivas a la PCR de género, solo una fuera positiva a la PCR específica de especie, puede deberse a dos factores: O bien a la mayor sensibilidad de la PCR anidada respecto a la PCR estándar, o bien a la presencia de otras especies de micoplasmas en los individuos muestreados. Respecto al primer factor, se conoce que la PCR anidada, utilizada en este caso para la detección de Mycoplasma spp. es más sensible, que la PCR estándar (Green y Sambrook, 2019). Otras técnicas más sensibles como la PCR en tiempo real ya están disponibles (Söderlund *et al.*, 2011; Płoneczka-Janeczko *et al.*, 2011) y podrían utilizarse en futuros estudios. Respecto al segundo factor, varias otras especies de micoplasmas, aparte de *M. felis* como *Mycoplasma felifaucium*, *M. feliminutum*, *M. gateae*, *Mycoplasrna leocaptivus*, *Mycoplasma leopharyngis* y *Mycoplasma simbae*, han sido aislados a partir del tracto respiratorio de felinos, incluyendo al gato doméstico (*Felis catus*), lince (*Felis lynx*), puma (*Felis concolor*), leopardo (*Panthera pardus*), león (*Panthera leo*), tigre (*Panthera tigrh*) y guepardo -*Acinonyx jubatus*- (Cole *et al.,* 1967; Heyward *et al.*, 1969; Hill, 1975, 1986, 1992). Particularmente en los gatos domésticos, *M. gateae*, *M. feliminutum, M. arginini, M. pulmonis, M. arthritidis, M. gallisepticum, Acholeplasma spp.* y *Ureaplasma spp* han sido asociados a infecciones del tracto respiratorio superior y *M. felis* y *M. gateae* a infecciones del tracto respiratorio inferior (Greene y Chalker, 2012, Lee Fowler, 2014). Lamentablemente, solo *M. felis* fue identificado en el presente estudio. Según el diseño de muestreo utilizado, los resultados sugieren que la prevalencia de Mycoplasma spp. sería superior al 15%, aunque obviamente, por el número de gatos muestreados y por el tipo de estudio, no podría ser extrapolado a la población de gatos de la ciudad de Río Cuarto. En este sentido, prevalencias más altas han sido informadas en otros estudios realizados en otras partes del mundo en gatos con sintomatología clínica compatible con CRF. Así, un estudio reciente realizado en España reveló que la prevalencia de M. felis fue del 46,5% en gatos con enfermedad de las vías respiratorias superiores, 38,3% en gatos con conjuntivitis y del 37,7% de gatos con gingivoestomatitis (Fernández *et al.*, 2017). Lamentablemente, en Argentina no existen demasiados antecedentes de la detección de micoplasmas en gatos con y sin sintomatología respiratoria compatible con CRF. En 1997, Copes *et al*., aislaron *M. felis* en seis gatos, constituyendo el principal precedente en la detección de este patógeno, pero no encontraron *M. gateae*. Por ello, este estudio podría ser un puntapié inicial para futuros estudios epidemiológicos en la región, muestreando un mayor número de individuos. Los resultados obtenidos en el presente informe, junto con referencias en la literatura señalan la importancia de la detección, no solamente de *Mycoplasma spp.* y *M felis*, sino de todos los agentes involucrados en el CRF. Ya se conoce que las co-infecciones son comunes en gatos con CRF (Fernández *et al.*, 2017; Nguyen *et al.*, 2019), además, se ha señalado que *M. felis* es el agente más prevalente en infecciones del tracto respiratorio superior (Nguyen *et al*., 2019). Esto constituye un llamado de atención tanto a los colegas clínicos y a aquellos de laboratorios de diagnóstico, para trabajar conjuntamente y así poder arribar a diagnóstico de certeza en gatos con CRF, dada la implicancia del mismo en el tratamiento de los pacientes. Por otro lado, la metodología de la toma de muestras realizado en este estudio podría recomendarse para la detección de agentes involucrados en el CRF, dado que se trata de muestras poco invasivas y fáciles de colectar. Por último, la presencia de *M. felis* y otras especies de micoplasmas se han asociado tradicionalmente a conjuntivitis, gingivoestomatitis y enfermedad de las vías respiratorias altas (Campbell *et al.,* 1973; Grene y Chalker, 2012, Fernandez *et al.*, 2017; Le Boedec, 2017; Nguyen *et al.*, 2019), aunque a *M. felis* también se lo ha asociado a meningoencefalomielitis (Beauchamp *et al.*, 2011), artritis (Liehmann *et al.*, 2006), asma y bronquitis crónica (Schulz *et al.*, 2014), por lo que también debería diagnosticarse en estos casos. Futuros estudios son necesarios no solo para determinar la prevalencia de micoplasmas en gatos en la región, sino también para identificar las especies más frecuentes y las co-infecciones con otros agentes involucrados en el CRF.

Agradecimientos

A Veterinaria Mi mascota y al área de IDi de ACERCA laboratorio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Beauchamp D.J., da Costa R.C., Premanandan C., Burns C.G., Cui J., Daniels J.B. (2011) *Mycoplasma felis*-associated meningoencephalomyelitis in a cat. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 13(2):139-43. doi: 10.1016/j.jfms.2010.10.004.

Campbell L.H., Snyder S.B., Reed C., Fox J.G. (1973). *Mycoplasma felis*-associated conjunctivitis in cats. *Journal of American Veterinary Medicine Association*. 163(8):991-5.

Chalker V.J., Owen W.M., Paterson C.J., Brownlie J. (2004). Development of a polymerase chain reaction for the detection of *Mycoplasma felis* in domestic cats. *Veterinary Microbiology*. 100 (1-2):77-82. doi: 10.1016/j.vetmic.2004.01.014.

Cohn, L. A. (2011). Feline respiratory disease complex. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice, 41*(6), 1273-1289.

Cole B. C., L. Golightly, J. R. Ward. (1967). Characterization of mycoplasma strains from cats. *Journal of Bacteriology*. 94:1451-1458

Copes, J., Nievas, V., Vigo, G., Castellanos, C., Stanchi, N. (1997). Aislamiento de Mycoplasma felis a partir de gatos con enfermedad respiratoria. *Avances En Ciencias Veterinarias, 12* (2). https://doi.org/10.5354/acv.v12i2.4798

Fernandez M., Manzanilla E.G., Lloret A., León M., Thibault J.C. (2017). Prevalence of feline herpesvirus-1, feline calicivirus, *Chlamydophila felis* and *Mycoplasma felis* DNA and associated risk factors in cats in Spain with upper respiratory tract disease, conjunctivitis and/or gingivostomatitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 19(4):461-469. doi: 10.1177/1098612X16634387.

Green M.R., Sambrook J. Nested Polymerase Chain Reaction (PCR) (2019). Cold Spring Harbour Protocols, 2019(2). doi: 10.1101/pdb.prot095182.

Greene CE and Chalker VJ (2012) Nonhemotropic mycoplasmal, ureaplasmal, and L-form infections. in: Greene CE (ed). infectious diseases of the dog and cat. 4th ed. St Louis, Mo: Elsevier Saunders, pp 319–325.

Heyward, J. T., M. Z. Sabry, W. R. Dowdle. (1969). Characterization of mycoplasma species of feline origin. *American Journal of Veterinary Research*. 30: 615-622.

Hill, A. C. (1975). Comparison of mycoplasmas isolated from captive wild felines. *Research in Veterinary Sciences*. 18:139-143.

Hill, A. C. (1986). *Mycopasma felifaucium,* a new species isolated from the respiratory tract of pumas. *The Journal of General Microbiology*. 132:1923-1928.

Hill, A. C. (1992). *Mycoplasrna simbae* sp. nov., *Mycopasma leophatyngzs* sp. nov., and Mycoplasma leocaptivus sp. nov., isolated from lions. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 425 18-523.

Liehmann L., Degasperi B., Spergser J., Niebauer G.W. (2006). *Mycoplasma felis* arthritis in two cats. *Journal of Small Animal Practice*. 47(8):476-9. doi: 10.1111/j.1748-5827.2006.00074.x.

Litster A., Wu C.C., Leutenegger C.M. (2015). Detection of feline upper respiratory tract disease pathogens using a commercially available real-time PCR test. *The Veterinary Journal*. 206(2):149-53. doi: 10.1016/j.tvjl.2015.08.001.

Nguyen D., Barrs V.R., Kelman M., Ward M.P. (2019). Feline upper respiratory tract infection and disease in Australia. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 21(10):973-978. doi: 10.1177/1098612X18813248.

Płoneczka-Janeczko K., Kiełbowicz Z., Bania J., Bednarek K. (2011). Real-time PCR detection of *Mycoplasma felis* in domestic cats suffering from chronic conjunctivitis (Poland). *Polish Journal of Veterinary Science*. 14(4):679-81. doi: 10.2478/v10181-011-0103-y.

Schulz B.S., Richter P., Weber K., Mueller R.S., Wess G., Zenker I., Hartmann K. (2014). Detection of feline Mycoplasma species in cats with feline asthma and chronic bronchitis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 16(12):943-9. doi: 10.1177/1098612X14524969.

Söderlund R., Bölske G., Holst B.S., Aspán A. (2011). Development and evaluation of a real-time polymerase chain reaction method for the detection of *Mycoplasma felis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(5):890-3. doi: 10.1177/1040638711407479.

Tang J., Hu M., Lee S., Roblin R. (2000). A polymerase chain reaction based method for detecting *Mycoplasma/Acholeplasma* contaminants in cell culture. *Journal of Microbiological Methods*, 39(2):121-6. doi: 10.1016/s0167-7012(99)00107-4.

Financiamiento
Fuente: El presente trabajo fue financiado con recursos de veterinaria Mi mascota y el área de IDi de ACERCA laboratorio.

Modelo de publicación sin fines de lucro para conservar la naturaleza académica y abierta de la comunicación científica
PDF generado a partir de XML-JATS4R

AmeliCA

Disponible en:
https://portal.amelica.org/ameli/ameli/journal/820/8205059004/8205059004.pdf

Cómo citar el artículo

Número completo

Más información del artículo

Página de la revista en redalyc.org

Sistema de Información Científica Redalyc
Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal
Modelo de publicación sin fines de lucro para conservar la naturaleza académica y abierta de la comunicación científica

Cecilia Hurras, Belén Mora, Pablo González, Pablo Tamiozzo

Detección molecular de Mycoplasma spp. en gatos con y sin signos clínicos compatibles con Complejo Respiratorio Felino

Molecular detection of Mycoplasma spp. in cats with and without Feline Respiratory Disease Complex-compatible clinical signs

Ab intus FAV-UNRC
vol. 7, núm. 13, 2024
Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina
abintus@ayv.unrc.edu.ar

ISSN-E: 2618-2734

DOI: https://doi.org/10.5281/zenodo.13136485

CC BY-NC 4.0 LEGAL CODE
Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0 Internacional.