



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
INSTITUTO UNIVERSITARIO DE SANIDAD ANIMAL Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

TESIS DOCTORAL

ESTUDIO TAXONÓMICO POLIFÁSICO DE BACTERIAS DEL GÉNERO
Mycoplasmas EN AVES SILVESTRES. DESCRIPCIÓN DE UNA
NUEVA ESPECIE; *Mycoplasma neophronis*



ALEJANDRO SUÁREZ PÉREZ

ARUCAS 2011

Alejandro Suárez Pérez

RESUMEN	7
SUMMARY	11
ABREVIATURAS	15

CAPÍTULO I. ESTUDIO TAXONÓMICO POLIFÁSICO DE BACTERIAS DEL GÉNERO MYCOPLASMA EN AVES SILVESTRES.

I.1. INTRODUCCIÓN	21
I.2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO	33
I.3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	
I.3.1. Micoplasmas.	
I.3.1.1. Características generales.....	39
I.3.1.2. Características ultraestructurales.....	40
I.3.1.3. Taxonomía y filogenia.....	41
I.3.1.4. Hábitats y enfermedades.....	43
I.3.1.5. Aislamiento e identificación.....	45
I.3.2. Micoplasmas aviaries.	
I.3.2.1. Evolución taxonómica.....	57
I.3.2.2. Micoplasmas aviaries patógenos.....	62
I.3.2.2.1 Aspectos clínicos.	
a) <i>Mycoplasma gallisepticum</i> (Mg).....	63
b) <i>Mycoplasma meleagridis</i> (Mm).....	65
c) <i>Mycoplasma iowae</i> (Mi).....	66
d) <i>Mycoplasma synoviae</i> (Ms).....	67
I.3.2.2.2. Epidemiología.....	67

I.3.2.2.3. Diagnóstico.....	68
I.3.2.2.4. Tratamiento.....	69
I.3.2.2.5. Control y profilaxis.....	70
I.3.2.3. Micoplasmas aislados en aves silvestres.	
I.3.2.3.1. Micoplasmas patógenos.....	71
I.3.2.3.2. Micoplasmas de patogenia incierta.....	74
I.3.2.3.3. Micoplasmas desconocidos o sin identificar...87	

I.4. MATERIAL Y MÉTODOS.

I.4.1. Aislamiento de micoplasmas aviáres.

I.4.1.1. Especies aviáres muestreadas.....	91
I.4.1.2. Toma de muestras y aislamiento de micoplasmas.....	91
I.4.1.3. Triple clonación.....	96
I.4.1.4. Almacenamiento de las cepas (Liofilización).....	96

I.4.2. Identificación de micoplasmas aviáres.

I.4.2.1. Pruebas orientativas.

I.4.2.1.1. Test de sensibilidad a la digitonina.....	97
I.4.2.1.2. Pruebas bioquímicas y enzimáticas.....	98
I.4.2.1.3. Electroforesis de proteínas (SDS PAGE).....	101
I.4.2.1.4. Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización (DGEE).....	104

I.4.2.2. Pruebas definitivas.

I.4.2.2.1. Prueba de inhibición del crecimiento.....	107
I.4.2.2.2. Análisis molecular del gen ARNr 16S y de la región intergénica (ISR).....	109

I.5. RESULTADOS.

I.5.1. Aislamientos de micoplasmas.....	115
I.5.2. Características de los cultivos (morfología de las colonias).....	120
I.5.3. Test de sensibilidad a la digitonina.....	122
I.5.4. Pruebas bioquímicas y enzimáticas.....	123
I.5.5. Electroforesis de proteínas (SDS PAGE).....	126
I.5.6. Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización (DGGE).....	128
I.5.7. Prueba de inhibición del crecimiento.....	146
I.5.8. Secuenciación y análisis filogenético del gen ARNr 16S y de la región intergénica (ISR).....	147
I.5.9. Resumen de resultados.....	156

I.6. DISCUSIÓN.

I.6.1. Aislamiento de cepas de micoplasmas en las aves silvestres del estudio.	169
I.6.2. Caracterización de las cepas aisladas.....	175
I.6.2.1. Caracterización de las cepas mediante el análisis serológico (prueba de inhibición de crecimiento) y la secuenciación del gen ARNr 16S.....	182
I.6.2.2. Caracterización de las cepas tras la secuenciación de la región intergénica (ISR) y su análisis filogenético.....	192

I.7. ANEXO: Medios y reactivos.....	197
--	-----

I.8. ANEXO: Secuencia de nucleótidos de las cepas del estudio.....	209
---	-----

CHAPTER II. *MYCOPLASMA NEOPHRONIS* SP. NOV., ISOLATED FROM UPPER RESPIRATORY TRACT OF CANARIAN EGYPTIAN VULTURE (*NEOPHRON PERCNOPTERUS MAJORENSIS*).

II.1. INTRODUCTION.....	235
II.2. MATERIALS AND METHODS.....	241
II.3. RESULTS AND DISCUSSION.	
II.3.1. Morphology and ultra structure.....	253
II.3.2. Growth characteristics.....	254
II.3.3. Sterol requirement.....	254
II.3.4. Biochemical characteristics.....	254
II.3.5. Hemadsorption.....	254
II.3.6. DNA base composition.....	254
II.3.7. Partial 16Sr RNA gene sequence.....	255
II.3.8. Protein pattern by gel electrophoresis.....	259
II.3.9. Serological test.....	259
II. 4. TAXONOMIC ASSIGNMENT.....	261
II. 5. ANNEXES.....	265
CONCLUSIONES.....	269
BIBLIOGRAFÍA.....	275
AGRADECIMIENTOS.....	315

RESUMEN

Alejandro Suárez Pérez

El estudio de la presencia de micoplasmas en aves silvestres ha generado un gran interés debido al papel que pueden desempeñar estas aves en la transmisión de especies reconocidas como patógenas. Asimismo, estos animales han sido escasamente analizados y existe una amplia probabilidad de identificar nuevos taxones bacterianos.

El siguiente trabajo estuvo basado, en primer lugar, en la caracterización fenotípica y en el análisis filogenético de 174 aislamientos de bacterias del género *Mycoplasma*, obtenidos a partir de 552 muestras procedentes de aves silvestres ingresadas en varios centros de recuperación y de aves pertenecientes a proyectos de cría en cautividad. Esta recogida de muestras se realizó durante el periodo comprendido entre los años 2007 y 2010 en diferentes puntos de la geografía española.

La identificación de estos aislamientos fue realizada en varias fases, con la utilización inicial de pruebas orientativas, como las características de los cultivos, las pruebas bioquímicas y el gel de gradiente de electroforesis desnaturizante (DGGE). Posteriormente se emplearon otras técnicas más específicas, como la prueba de inhibición de crecimiento y el estudio del gen ARNr 16S y de la región intergénica entre los genes 16S y 23S ARNr (ISR).

En este sentido, las pruebas orientativas utilizadas en el transcurso de esta tesis doctoral simplificaron la tipificación posterior de los aislamientos. Además, los resultados observados tras la utilización de la técnica DGGE revelan que dicha prueba favorece, en gran medida, la realización de estudios epidemiológicos de micoplasmas en aves silvestres.

Por otro lado, los resultados observados tras la realización de las pruebas serológicas y el análisis filogenético de estas cepas denotan una gran diversidad de micoplasmas en aves silvestres.

Según las técnicas utilizadas, se observa que en el 89% de los aislamientos solo se ha podido alcanzar la identificación de género, con lo que es muy probable que muchos de estos aislamientos sean especies nuevas no descritas hasta el momento.

Entre los micoplasmas identificados en las aves silvestres del estudio, destaca la presencia de *M. iowae* en la especie *Burhinus oedicnemus* (alcaraván común), por lo que dicha especie podría actuar como reservorio del mismo, constituyendo una posible fuente de infección para las aves domésticas. Los resultados negativos de estos micoplasmas, considerados patógenos en aves de corral, indicarían una baja implicación de estas bacterias en las aves silvestres ingresadas en los centros de recuperación.

La segunda parte de esta tesis se basó en la descripción de seis cepas aisladas en la especie *Neophron percnopterus majorensis* como una nueva especie del género *Mycoplasma*, que ha sido denominado como *Mycoplasma neophronis*. Para este trabajo se siguieron todas las recomendaciones del *International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes*.

SUMMARY

Alejandro Suárez Pérez

The study of the incidence of *Mycoplasma* spp. in wild birds has generated great interest for the potential role of these birds in the transmission of pathogenic *Mycoplasma*. Furthermore, these animals have been poorly studied and there is much possibility to identify new bacterial taxa.

The first part of this thesis was based on the phenotypic characterization and phylogenetic analysis of 174 *Mycoplasma* isolated from 552 samples obtained from wild birds entered in several centers of wild birds rescue. This sampling was conducted during a period between 2007 and 2010 in different places of the Spanish geography.

The identification of these isolates was carried out in phases. Initial testing was based on culture, biochemical tests and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). After that, more specific techniques were employed, like growth inhibition test, study of the 16Sr RNA gene and intergenic regions (ISR).

The tests used for guidance during this thesis further simplified the characterization of isolates. Also, the results observed after using DGGE shown that technique could be used as an excellent tool for epidemiological studies on *Mycoplasma* spp. in wild birds.

On the other hand, the results obtained after the completion of serological and phylogenetic analysis of these strains denoted a variety of mycoplasma in wild birds, which reinforces the findings of other previous researchers.

According to the techniques used, we observed that in 89% of the isolates the identification could only be reached down to Genus level, evidencing a high likelihood of these isolates to be new species not described until now.

Among mycoplasmas identified in this study, the presence of *M. iowae* in *Burhinus oedicephalus* (Stone curlew) should be highlighted, due to the possibility of this wild bird species to act as a reservoir for a pathogenic *Mycoplasma*, being a potential source of infection for domestic poultry. The negative results of these mycoplasmas, which are considered pathogenic in poultry, would indicate a low association of these bacteria in wild birds.

The second part of this thesis is based on the description of six strains isolated in the *Neophron percnopterus majorensis* as a new species of *Mycoplasma*, which has been named *Mycoplasma neophronis*. For this work we have followed the recommendations of the International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of *Mollicutes*. This species has been accepted as a new member of the Class *Mollicutes*.

ABREVIATURAS

Alejandro Suárez Pérez

ADN: Ácido desoxirribonucleico
ADNr: Ácido desoxirribonucleico ribosómico
ADS: Asociación de defensa sanitaria
APS: Persulfato de amonio
ARN: Ácido ribonucleico
ARNr: Ácido ribonucleico ribosómico
ARNt: Ácido ribonucleico de transferencia
ATCC: *American Type Culture Collection*
C: cloaca
CERI: Centro de Estudios de Rapaces Ibéricas
Ce: cerebro
Co: coana
CR: Centro de Recuperación
DGGE: *Denaturing gradient gel electrophoresis*
DSM: *German collection of microorganisms and cell cultures*
g: gramo
HPLC: *High performance liquid chromatography*
ISR: Región intergénica entre los genes 16S y 23S ARNr.
kDa: Kilodalton
M: *Mycoplasma*
mA: miliamperio
Mg: *Mycoplasma gallisepticum*
Mm: *Mycoplasma meleagridis*
Mi: *Mycoplasma iowe*
ml: mililitro
mm: milímetro
min: minutos

Ms: *Mycoplasma synoviae*

µm: micrómetro

PBS: *Phosphate buffered saline*

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PM: Peso Molecular

RAPD: *Randomly amplified polymorphic DNA*

Rpm: revoluciones por minuto

SDS: Sodio Dodecil Sulfato

SDS PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS

T: tráquea

ufc: unidades formadoras de colonias

CAPÍTULO I

ESTUDIO TAXONÓMICO POLIFÁSICO DE BACTERIAS DEL GÉNERO *MYCOPLASMA* EN AVES SILVESTRES.

Alejandro Suárez Pérez

I.1. INTRODUCCIÓN

Alejandro Suárez Pérez

Esta tesis doctoral forma parte de una línea de investigación desarrollada por la Unidad de Epidemiología y Medicina Preventiva de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Fundamentalmente se ha profundizado en el estudio y conocimiento de la diversidad bacteriana, concretamente en el análisis epidemiológico y taxonómico de especies del Género *Mycoplasma* en aves silvestres, lo que nos permitirá conocer mejor la distribución de estos microorganismos en estas especies.

Para ello, ha sido muy importante la magnífica colaboración de las siguientes instituciones: el Centro de Recuperación de Fauna Silvestre del Cabildo de Gran Canaria (Tafira), el Centro de Recuperación de Ciudad Real (El Chaparrillo), el Centro de Recuperación de Valencia (El Saler) y el Centro de Estudios de Rapaces Ibéricas de Toledo (CERI).

¿Qué es la Taxonomía polifásica?

Colwell (1970) definió la “Taxonomía polifásica” como la ciencia que trata de los principios, métodos y fines de la clasificación. Se aplica en particular en la biología para la ordenación jerarquizada y sistemática, con sus nombres, grupos o taxones.

Es una herramienta utilizada en la delimitación de los taxones a todos los niveles, y se caracteriza por el empleo de varias técnicas, tanto moleculares como fenotípicas.

Biodiversidad biológica y bacteriana.

La biodiversidad o diversidad biológica es la amplia variedad de seres vivos sobre la Tierra y los patrones naturales que la conforman, resultado de miles de millones de años de evolución según procesos naturales y de la influencia creciente de las actividades del ser humano. Dentro de la biodiversidad destacamos la biodiversidad bacteriana, cuya existencia no debemos pasar por alto y que supone un mundo en gran parte ignoto y apasionante, imprescindible para la vida (De Castro, 2001).

En la actualidad los investigadores han descrito más de diez mil especies de virus y bacterias, pero todos coinciden en afirmar que esto es solo una pequeña fracción de lo que queda por descubrir debido a diferentes razones:

En primer lugar, la constitución genética de las bacterias es poco estable, varía con rapidez y el intercambio de material genético entre lo que deberían ser especies distintas es relativamente frecuente.

En segundo lugar, las bacterias son difíciles de detectar, hay una gran mayoría representada por pocos ejemplares que, además, no crecen en los medios de cultivos habituales y, una bacteria que no crece formando colonias en una placa con nutrientes, difícilmente puede ser estudiada.

No obstante, existen métodos indirectos no ya para reconocer las especies, sino al menos para estimar el número de ellas que debe haber en una muestra. Usando este tipo de técnicas, investigadores noruegos calcularon que en un solo gramo de suelo de hayedo habría entre cuatro mil y cinco mil especies diferentes de bacterias, es decir, casi tantas como las que hasta hoy han sido descritas en el mundo (De Castro, 2001).

Estudio de las enfermedades en la fauna silvestre.

El estudio de las enfermedades en los animales silvestres es una disciplina científica relativamente nueva cuando se compara con el estudio de las enfermedades en la especie humana o en los animales domésticos (Wobeser, 2006).

Un factor fundamental del aumento de los estudios de las enfermedades en los animales silvestres ha sido el fuerte desarrollo de la conciencia sobre la implicación de estos animales en las enfermedades infecciosas que pueden afectar a la especie humana. Por otro lado, los veterinarios y los agrónomos han mostrado un gran interés debido a la intervención de los animales silvestres en muchas enfermedades de los animales domésticos (Wobeser, 2006); los biólogos de la conservación se interesan cada vez más por las enfermedades al reconocer que pueden desempeñar un papel importante en la supervivencia de las especies amenazadas o en peligro de extinción (Daszak y cols., 2000; Cleaveland y cols., 2001).

El interés por el estudio de las enfermedades en los animales silvestres también se ha incrementado entre los ecólogos, especialistas en comportamientos y los biólogos de poblaciones, que están interesados en aspectos de la coevolución de los agentes patógenos y sus hospedadores (Wobeser, 2006).

En la mayoría de estos estudios, se considera que las enfermedades en la fauna silvestre son una característica ambiental entre muchas otras, y resulta imposible comprender las enfermedades sin considerar las interacciones entre los agentes de la enfermedad con otros factores como la nutrición, la predación, el clima y la reproducción.

Las principales causas que producen enfermedades en la fauna silvestre están producidas por tóxicos, contaminantes ambientales o agentes infecciosos como los virus, bacterias, hongos, ciertas algas, protozoos, helmintos y artrópodos (Anderson & May, 1979).

En este sentido, los Postulados de Koch trataron de establecer la relación entre la causa y la enfermedad después del descubrimiento de los microorganismos, pero estos postulados no son adecuados para comprender la causalidad de muchas enfermedades de la fauna silvestre (Hanson, 1969) por varios motivos; (a) hay relativamente pocos agentes que sean necesarios y suficientes para producir una enfermedad en una amplia gama de condiciones ambientales, (b) una única enfermedad puede precisar la interacción de varias causas, (c) una misma enfermedad puede estar causada por varios factores diferentes y (d) un mismo agente puede causar varias enfermedades distintas.

Por último, es necesario destacar que, al igual que en un iceberg solo una pequeña parte del hielo es visible sobre la superficie del agua, la mayor parte de las enfermedades de la fauna silvestre está oculta a la vista. Además, resulta complicado detectar la enfermedad oculta porque muy poca gente la busca y no se observa a los animales silvestres de manera regular (Wobeser, 2006).

Papel de las enfermedades infecciosas en las patologías que afectan a la fauna silvestre.

Las enfermedades infecciosas implican una relación trófica entre el microorganismo causal y el animal, relación de la cual el microorganismo obtiene un beneficio y el animal resulta dañado.

Es importante diferenciar, al hablar de las enfermedades infecciosas, entre la presencia de un agente que posee la capacidad de producir una enfermedad en el animal (infección) y la aparición de una disfunción causada por la presencia de ese organismo (enfermedad). Muchos animales están infectados sin estar enfermos o un agente puede causar una infección sin enfermedad en una especie, mientras que en otra especie puede ocasionar una grave disfunción (Wobeser, 2006).

Por otro lado, un agente puede aparecer en forma de infección subclínica en algunos individuos y causar enfermedad en otros de la misma especie, o bien un individuo puede estar infectado sin sufrir la enfermedad bajo ciertas circunstancias y enfermar gravemente en otras (Wobeser, 2006).

Uno de los principales factores que pueden influir en la disfunción del animal como resultado de la infección es la intensidad de la misma, es decir, el número de microorganismos por hospedador infectado (Ebert y cols., 2000).

Debemos distinguir entre los animales que son infectados y aquellos que son infecciosos. No todas las enfermedades infecciosas son contagiosas, es decir, capaces de ser transmitidas de un individuo a otro, incluso dentro de los agentes que son

contagiosos, no todos los individuos infectados son capaces de transmitir la infección a otros animales. Algunas infecciones pasan una fase latente en la que permanecen ocultas, no causan enfermedad y no son contagiosas. Otras infecciones puede que no desarrollen estadios reproductivos en todas las especies de hospedadores (Wobeser, 2006).

A medida que los científicos han podido examinar el material genético de los agentes infecciosos con mayor detalle, se ha comprobado con claridad que los animales con enfermedades infecciosas suelen estar infectados por más de un genotipo del mismo agente. Esta competencia entre agentes infecciosos estrechamente relacionados entre sí puede tener implicaciones importantes para la comprensión de la enfermedad pero sigue siendo en buena parte un concepto teórico por el momento (Read & Taylor, 2001).

Importancia del estudio de las enfermedades infecciosas en las aves silvestres.

Las aves silvestres y el estudio de los patógenos que les afectan son temas de gran interés para muchos científicos y profesionales clínicos que trabajan en la conservación de estas especies, sobre todo en aquellas aves que se encuentran al borde de la extinción ya que son muy susceptibles de padecer brotes infecciosos que podrían mermar el tamaño de la población, con lo que toda la información que podamos aportar sobre su salud podría ser de gran importancia en un futuro cercano.

En España existen más de 300 especies de aves silvestres que en su mayoría poseen una alta movilidad o son especies migratorias. Algunas de estas aves tienen un

alto contacto con el medio y los residuos humanos y, en los últimos años, han cambiado drásticamente sus hábitos alimenticios y sus hábitats.

Por otro lado, hay que incidir en la falta de información de que disponemos y las dificultades existentes a la hora de hacer estudios científicos con aves silvestres si lo comparamos con la clínica de animales domésticos, por varias razones: (a) la mayoría de las aves silvestres, como mecanismos de supervivencia, no presentan signos clínicos hasta que están gravemente enfermas, (b) estos síntomas son muy vagos y comunes a muchas enfermedades diferentes y (c) la manipulación, toma de muestra, diagnóstico, tratamiento y recuperación de estos animales es bastante complicado.

Por último, debemos destacar que la mayoría de las aves accidentadas o enfermas son atendidas en centros de recuperación de fauna silvestre cuyo trabajo es esencial para la supervivencia de las especies protegidas, pero podrían representar en algunos casos un reservorio de microorganismos patógenos al agruparse una alta densidad de aves silvestres en un mismo sitio durante un periodo prolongado (Lecis y cols., 2010b).

Micoplasmas en aves silvestres.

La presencia de bacterias del Género *Mycoplasma* en aves silvestres ha sido descrita por muchos autores (Bradbury, 1988b, Poveda y cols., 1990a y Lierz y cols., 2002, 2008a, b, c, d) pero en la mayoría de estos estudios no queda claro su papel como patógeno principal. En otras ocasiones, se describe la presencia de patógenos como clamidias o virus como *Pneumovirus aviar* (APV) asociados a la presencia de micoplasmas sin saber hasta qué punto estos puedan ejercer un efecto sinérgico (Höfle y cols., 2002).

La dificultad de estos estudios se basa en que el aislamiento de estas bacterias en aves silvestres es muy complicado y esta dificultad se puede ver reflejada en trabajos como los de Whaling (2009) que no consiguió aislar micoplasmas. Su trabajo se basó en el estudio de la presencia de micoplasmas en una serie de aves migratorias capturadas con redes. Una de sus conclusiones revela que una de las causas que impide aislar micoplasmas es que las aves capturadas con redes son las capaces de volar, y por lo tanto están generalmente en buen estado de salud, sin embargo, los animales muy enfermos (posibles portadores de micoplasmas), no muestran tanta actividad como las aves sanas, por lo que hay menos probabilidad de que sean atrapadas en estas redes. Otra de las razones para la obtención de estos resultados negativos es que en los bastoncillos no hubiera suficiente carga de micoplasmas, por lo que se necesitarían muestras más grandes, pero éstas son difíciles de obtener sin perjudicar al pájaro. La última conclusión que expone esta investigadora es que ninguna de estas aves migratorias había tenido contacto con poblaciones silvestres o domesticadas infectadas.

La discusión final de el estudio de Whaling (2009) aporta la idea de que los micoplasmas no constituyen parte de la micropoblación normal en las vías respiratorias de las aves pequeñas o migratorias; afirma que para aumentar el número de aislamientos de micoplasmas en estas aves es necesario la eutanasia y disección de la tráquea inmediatamente después de la muerte, además habría que actuar sobre poblaciones silvestres que estén más estrechamente relacionadas con pavos, pollos y pinzones domésticos.

Por otro lado, es muy interesante investigar hasta qué punto los micoplasmas actúan como patógenos principales en los programas de cría en cautividad de aves en peligro de extinción, indagar el papel que estos microorganismos puedan desempeñar

en el éxito reproductivo en estos proyectos y evaluar el riesgo de liberar patógenos a las poblaciones silvestres (Lierz y cols., 2008d).

En estos proyectos se trabajan, en la mayoría de las ocasiones, con animales admitidos en los centros de recuperación que pasan por periodos prolongados de tratamiento: cirugías, manipulación veterinaria intensiva, etc., procesos todos ellos tremendamente estresantes. Más aún, mediante el refuerzo procedente de estas experiencias negativas, se acentúa el temor hacia todos los estímulos inherentes a la condición de cautividad: voces, ruidos, silueta o actividad humana. El resultado de este círculo de retroalimentación negativa es una situación de estrés crónico (Höfle & Blanco, 2001).

En el proyecto de cría en cautividad del águila imperial ibérica (*Aquila adalberti*) en el Centro de Estudios de Rapaces Ibéricas se han observado estos efectos, y los estudios comparativos realizados entre especies indican una respuesta de las águilas en general ante un estrés agudo o puntual. La suma de estímulos concatenados tendente a la cronicidad produce un patrón lesivo y aberrante. Se constata que en el colectivo de águilas imperiales que generan este patrón, la incidencia de ciertas enfermedades fúngicas se multiplica por veinte en relación a las aves adaptadas al medio (Höfle y cols., 2001b).

En este mismo estudio se han aislado bacterias del género *Salmonella* y *Mycoplasma* en el aparato reproductor de las águilas imperiales salvajes y cautivas que afectaron la salud y viabilidad de los embriones. Höfle y cols. (2001a) y Höfle & Blanco (2001) constatan que estas enfermedades limitan el crecimiento y en ocasiones ponen en peligro la vida de los pollos de águila imperial en la naturaleza. Asimismo, han

observado que los micoplasmas pueden llegar a resistir la congelación en nitrógeno líquido (-196°C), lo que da una idea de su resistencia.

Por último hay que destacar que un alto porcentaje de micoplasmas aislados en aves silvestres corresponde a especies nuevas no identificadas. Es importante conocer en qué medida estas bacterias pueden afectar a las aves silvestres pero también hay que recordar que no está del todo claro el papel que desempeñan estas aves en la transmisión de algunas especies de micoplasmas que provocan graves daños en la industria avícola.

I.2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Alejandro Suárez Pérez

El **objetivo general** de esta Tesis Doctoral fue el aislamiento y análisis taxonómico de cepas de micoplasmas aisladas a partir de aves silvestres en diferentes puntos de la península ibérica, así como en las aves ingresadas en el Centro de Recuperación de Fauna Silvestre de “Tafira” en Gran Canaria entre los años 2007 y 2010.

Los **objetivos específicos** de este trabajo fueron:

1. Desarrollar un método eficaz para el aislamiento y cultivo de micoplasmas en aves silvestres.
2. Realizar la caracterización genotípica y fenotípica de cepas de micoplasmas aisladas en aves silvestres a partir de los resultados obtenidos con las pruebas orientativas: morfología de las colonias, test de sensibilidad a la digitonina, pruebas bioquímicas y electroforesis de proteínas (SDS PAGE) y los resultados obtenidos con las pruebas definitivas: técnica de inhibición de crecimiento, el estudio del gen ARNr 16S y de la región intergénica (ISR).
3. Estudiar el uso de la Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización (DGGE) como técnica que simplifique la identificación y la detección masiva de aislamientos de micoplasmas en aves silvestres.
4. Investigar el papel de las aves silvestres ingresadas en los centros de recuperación de fauna silvestre como posibles portadoras de micoplasmas patógenos.

5. Mejorar el conocimiento de la diversidad biológica en aves en peligro de extinción mediante la identificación y descripción de nuevas especies del Género *Mycoplasma*.
6. Investigar si existe una relación especie específica de los micoplasmas con las aves silvestres.

I.3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Alejandro Suárez Pérez

I.3.1. Micoplasmas.

I.3.1.1. Características generales.

Los micoplasmas son procariotas de pequeño tamaño pertenecientes al Orden *Mycoplasmatales*, Familia *Mycoplasmataceae* que engloba dos géneros: *Mycoplasma* y *Ureaplasma*. Aunque el primer cultivo de micoplasmas se remonta al año 1898, su naturaleza, la relación con otros organismos y el estatus taxonómico fueron durante mucho tiempo un enigma para los microbiólogos (Shmuel & Hayflick, 2010).

Asimismo, son bacterias que carecen de pared celular ya que son incapaces de sintetizar peptidoglucano. Esta ausencia de pared celular se refleja en su nomenclatura: *Mollicutes*, del latín *mollis* (fina) y *cutis* (piel). Taxonómicamente, esta característica hace que los micoplasmas se encuentren en una clase aparte del resto de las bacterias (Nicolet, 1996).

Las células de las bacterias de este género son muy pequeñas, con un tamaño que oscila entre 0,1 y 0,25 μm y un volumen celular equivalente al 5% de un bacilo típico y, debido a su tamaño y plasticidad que les permitía atravesar los filtros, fueron considerados en un principio como virus (Poveda y cols., 2002).

Estas bacterias pueden crecer en medios artificiales que les proporcionen esteroides y les satisfagan otros requerimientos nutricionales o físicos especiales. Las colonias formadas en estos medios de cultivo miden, en su mayoría, menos de 1 mm de diámetro y tienen un aspecto característico de “huevo frito” cuando se observan al microscopio (Poveda, 1998).

I.3.1.2. Características ultraestructurales.

Los micoplasmas poseen solo aquellos orgánulos y rutas metabólicas indispensables para su crecimiento y replicación. Así, su estructura se reduce a una membrana citoplasmática, una molécula bicatenaria circular de ADN, moléculas de ARN, ribosomas y gránulos citoplasmáticos. No presentan orgánulos subcelulares organizados, como mitocondrias, ni tampoco membranas intracitoplasmáticas, por lo que poseen solamente un tipo de membrana. La membrana citoplasmática muestra una estructura trilaminar compuesta por dos tercios de proteínas y un tercio de lípidos. Es estructuralmente similar a las membranas celulares de las células eucariotas y es lo único que separa el citoplasma del medio ambiente. En su mayoría contiene fosfolípidos y glucolípidos, que, junto a las proteínas, constituyen los determinantes antigénicos más importantes. Al no tener pared celular, necesitan vivir en un entorno de elevada presión osmótica para que exista un equilibrio osmótico con respecto al medio interior del microorganismo (Poveda y cols., 2002).

El genoma de los micoplasmas es el menor de todos los organismos vivos conocidos, como consecuencia, estas bacterias son muy dependientes de su hospedador para cubrir sus exigentes necesidades nutricionales (Fraser y cols., 1995).

A pesar de su pequeño genoma, algunos micoplasmas como *M. gallisepticum* y *M. synoviae* son capaces de producir variaciones significativas de antígenos de superficie y *M. gallisepticum* también es capaz de invadir células. Estas propiedades son capaces de ayudar a los micoplasmas a evitar los mecanismos de defensa del hospedador y pueden explicar por qué pueden persistir durante largos periodos y superar una aparentemente buena respuesta inmune. La localización intracelular puede también

explicar por qué los tratamientos con antibióticos no eliminan necesariamente la infección (Bradbury & Kleven, 2008).

Debido al pequeño genoma de estas bacterias, no es de extrañar que *M. genitalum* fuera una de las primeras bacterias cuyo genoma fuera secuenciado completamente (Fraser y cols., 1995). Desde entonces, otros *Mollicutes* han sido secuenciados y publicados incluyendo micoplasmas patógenos como *M. gallisepticum* (Papazisi y cols., 2003).

En este sentido, al comparar los tamaños de los genomas de *M. genitalium* (580 kb), con los de otras bacterias como *Haemophilus influenzae* (1830 kb) o *Escherichia coli* (4.720 kb) se observa una diferencia notable entre ellas (Razin, 1997).

1.3.1.3. Taxonomía y filogenia.

La filogenia de los micoplasmas ha sido aclarada mediante el análisis secuencial del gen ARNr 16S (Woese y cols., 1980) y se descubrió que forman un grupo coherente de organismos relacionados con los clostridios (bacterias Gram positivas), pero con una elevada tasa de mutaciones (Woese y cols., 1985).

Basándose en los estudios filogenéticos de especies de la clase *Mollicutes* y de otros descubrimientos, tanto moleculares como fisiológicos (Tully & Whitcomb., 1995) se propuso la siguiente taxonomía:

Phylum Tenericutes

Clase I Mollicutes

Orden I Mycoplasmatales

Familia Mycoplasmataceae

Género Mycoplasma

Género Ureaplasma

Familia Incertae sedis

Género Eperythrozoon

Género Haemobartonella

Orden II Entomoplasmatales

Familia I Entomoplasmataceae

Género Entomoplasma

Género Mesoplasma

Familia II Spiroplasmataceae

Género Spiroplasma

Orden III Acholeplasmatales

Familia I Acholeplasmataceae

Género Acholeplasma

Familia Incertae sedis

“Candidatus Phytoplasma”

Orden IV Anaeroplasmatales

Familia Anaeroplasmataceae

Género Anaeroplasma

Género Asteroleplasma

Neimarck y cols. (2001) propusieron transferir algunos miembros del género *Haemobartonella* y *Eperythrozoon* al Género *Mycoplasma*.

Dentro del género *Mycoplasma*, las diferentes especies están agrupadas en los denominados grupos (cluster): *spiroplasma*, *pneumoniae*, *hominis*, *anaeroplasmata*, *asteroleplasma* (Weisburg y cols., 1989) y recientemente se ha añadido un sexto grupo, el de los *haemoplasmas* (Peters y cols., 2008).

I.3.1.4. Hábitats y enfermedades.

Las bacterias del Género *Mycoplasma* están ampliamente extendidas en la naturaleza como parásitos de humanos, mamíferos, reptiles, artrópodos y plantas (Razin, 1995). La cantidad de hospedadores conocidos superan los 120 en la actualidad.

Ningún otro grupo de procariontes ha provocado tanta controversia al establecer su patogenicidad, como los micoplasmas. Sus determinantes de virulencia son indudablemente complejos, y sus propiedades biológicas los diferencian de las típicas bacterias patógenas. Muchas especies de micoplasmas parecen formar parte de la población microbiana de personas y animales sanos por lo que la asociación de estos microorganismos con enfermedades complica el diagnóstico. Sin embargo, los micoplasmas por sí mismos pueden causar enfermedades agudas y crónicas en múltiples localizaciones y con una amplia gama de complicaciones (Baseman & Tully, 1997).

El papel fundamental de los micoplasmas en enfermedades específicas en humanos, animales, insectos y plantas es irrefutable. Poseen una alta especificidad del hospedador para producir la enfermedad. Esto puede deberse a factores de colonización específicos, para los cuales los hospedadores presentan receptores, como es el caso de *M. pneumoniae* y *M. gallisepticum* (Gourlay & Howard, 1982). También puede deberse a la incapacidad del hospedador para reconocer y responder a este microorganismo.

Mientras que la mayoría de los micoplasmas tiene una especificidad del hospedador absoluta (*M. hyopneumoniae*, *M. meleagridis*, *M. ovipneumoniae*), otros pueden ser patógenos de una especie de hospedador y colonizar diferentes hospedadores sin producir enfermedad. Otro grupo de micoplasmas tiene una pequeña o nula especificidad, pero no son patógenos (Rosendal, 1988).

La diseminación sistémica puede seguir a la colonización de la mucosa, particularmente en hospedadores con las defensas debilitadas. Algunas especies de micoplasmas tienen tropismo por una zona anatómica, por ejemplo, los anaeroplasmas (anaerobios obligatorios) solo han sido encontrados en el rumen de ovinos y bovinos; los espiroplasmas y fitoplasmas se han encontrado en los intestinos y glándulas salivales de artrópodos (Rosendal, 1988).

Según Rosendal (1988), las enfermedades causadas por micoplasmas en animales pueden clasificarse de modo preliminar en:

1. Enfermedades en las que la septicemia es la característica principal. Se presenta de forma aguda con fiebre y a menudo desemboca en la muerte en pocos días.
2. Enfermedades que implican una fase micoplásmica irreconocible, septicémica, seguida de localización e inflamación de cavidades serosas y/o articulaciones.
3. Enfermedades locales en el tracto respiratorio, tracto genital, glándula mamaria o en la conjuntiva. Este grupo de enfermedades puede desarrollarse después de la multiplicación local incontrolada de micoplasmas y la afectación de las partes más sensibles del sistema u órgano.

Las infecciones por micoplasmas normalmente son leves y de naturaleza crónica. Las tres localizaciones más comunes en los humanos y animales son el tracto respiratorio (neumonía, aerosaculitis y sinusitis), el tracto genitourinario, las glándulas mamarias (abortos, vaginitis, vesiculitis seminal, infertilidad y mamitis) y las articulaciones (artritis) (Howard & Gourlay, 1978; Tully, 1985; Yoder, 1990).

En la mayoría de los microorganismos, estrechamente adaptados a su hospedador, la enfermedad como resultado de la infección es la excepción más que la regla. Las enfermedades producidas por micoplasmas son el típico ejemplo de enfermedades multifactoriales. Para que se produzcan la infección y la enfermedad se necesitan diversos factores como: infecciones recurrentes, hacinamiento de animales o personas, condiciones climáticas rigurosas, edad, constitución genética, manipulación de los animales, estrés, etc. (Rosendal, 1988; DaMassa y cols., 1992).

I.3.1.5. Aislamiento e identificación.

El aislamiento de los micoplasmas a partir de muestras clínicas depende de un número de condiciones críticas. Algunas están relacionadas con factores derivados del hospedador, tales como anticuerpos específicos, antibióticos o componentes inhibitorios presentes en la mayoría de los tejidos de los vertebrados (citoquinas, lisolecitinas, etc), y en homogeneizados de insectos o plantas. Otros factores cruciales son la aplicación de técnicas de cultivo adecuadas y la evaluación de la calidad de los medios de cultivo (Rosenbusch, 1994).

Las muestras biológicas sospechosas de contener micoplasmas se tienen que mantener húmedas y en refrigeración y deben procesarse lo antes posible. El

sobrecrecimiento de bacterias constituye normalmente un problema más serio que la supervivencia de los micoplasmas en las muestras de los animales infectados (Rosenbusch, 1994).

Las muestras de animales vivos se limitan a las secreciones corporales en lugares accesibles, donde se puede pasar una torunda de algodón estéril. Los animales muertos tienen que estar en buen estado de conservación y las mejores muestras para cultivar son los tejidos afectados con lesiones visibles (Whitford, 1994).

En los estudios postmortem, las muestras se deben sumergir en alcohol y luego flamear para reducir la contaminación superficial. Posteriormente se realiza un corte con bisturí para poder introducir una torunda de algodón estéril. Si no se van a cultivar directamente, se deben introducir en un medio de transporte adecuado como el medio Amies (sin carbón vegetal) o Stuart. No se recomienda macerar trozos de muestra en medio de cultivo o en tampón fosfatosalino, ya que se pueden liberar sustancias tóxicas para los micoplasmas (Whitford, 1994).

Hay que prestar una especial atención al tipo de torundas empleadas para la recogida de muestras, sobre todo con los micoplasmas aviares. Se ha demostrado que las torundas de algodón en un bastoncillo de madera o plástico son más apropiadas para producir crecimiento si se mantienen en el medio durante la incubación, mientras que las torundas de rayón sobre un alambre de aluminio causan inhibición de crecimiento (Zain & Bradbury, 1995).

El porcentaje más alto de aislamientos se consigue cuando las muestras se cultivan pocas horas después de su obtención. Si no se van a poder cultivar en el mismo día, se deben congelar a -70°C . Para aumentar las probabilidades de aislamiento de

micoplasmas las muestras se deben cultivar tanto en medio sólido como en líquido (Whitford, 1994).

La mayoría de los micoplasmas crece pobremente en condiciones aeróbicas, por lo que es recomendable emplear una incubadora en la que haya entre un 5 y un 10 % de CO₂ bombeado a través de agua para mantener una humedad alta. Tampoco se recomienda la utilización de jarras con velas, dado que pueden generar productos tóxicos que inhiben el crecimiento de estos microorganismos (Whitford, 1994).

La mayor parte de las colonias de micoplasmas, en medio sólido, presentan la típica forma de “huevo frito” donde hay una zona central opaca de profundo crecimiento en el agar, probablemente por una ligera actividad proteolítica y una zona periférica translúcida, debida al crecimiento sobre la superficie. Las pequeñas colonias de ureaplasmas, por lo general, carecen de esta zona periférica y cuando en el medio hay cloruro de calcio o de manganeso, forman colonias oscuras (Poveda & Nicholas, 1998).

Las variaciones en el tamaño de las colonias (entre 15 - 60 µm en ureaplasmas o hasta 2 mm en algunos micoplasmas) tienen una base genética, aunque existe también heterogeneidad dentro de una misma especie. Los micoplasmas que crecen más rápidamente en el agar son los que producen colonias relativamente grandes, ya que contienen mayor número de células que las colonias pequeñas. Sin embargo, el tamaño y apariencia de las colonias no dependen únicamente de la especie, sino también de los componentes, grado de hidratación de los medios, concentración del agar, condiciones atmosféricas o edad del cultivo y el tamaño de las colonias siempre se reduce cuando existe una alta densidad de bacterias (Poveda & Nicholas, 1998).

Test de sensibilidad a la digitonina:

Este método, desarrollado por Freundt y cols. (1973), es un procedimiento indirecto para conocer los requerimientos de esteroides de los micoplasmas y para evaluar la inhibición del crecimiento en medio sólido producida por la digitonina.

Con esta prueba se pueden diferenciar dos tipos de *Mollicutes*, por un lado los que requieren colesterol: Géneros *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Entomoplasma*, *Spiroplasma* y *Anaeroplasma* y por el otro, los que no requieren colesterol: Géneros *Mesoplasma*, *Acholeplasma* y *Asteroleplasma* (Poveda y cols., 2002).

Los *Mollicutes* que requieren colesterol para vivir incorporarán la digitonina a sus membranas desorganizándolas, por lo que se podrá observar un halo de inhibición mayor de 5 mm alrededor los discos (Poveda & Nicholas, 1998).

Pruebas bioquímicas:

Debido a la simplicidad metabólica de estas bacterias, el número de técnicas disponibles para detectar sus actividades enzimáticas específicas y sus requerimientos nutricionales es relativamente pequeño. Aun así, los métodos de identificación bioquímicos y enzimáticos son importantes tanto en la diferenciación básica, como en el nivel de familia y género (Poveda & Nicholas, 1998).

Sin embargo, estas técnicas no son cuantitativas, y a veces presentan problemas a la hora de interpretar los resultados cuando hay bajas cantidades de células, o cuando se utilizan medios complejos que contienen una amplia variedad de sustratos alternativos (Miles & Agbanyim, 1998).

Ejemplos de pruebas bioquímicas son: la hidrólisis de la urea que define a los miembros del género *Ureaplasma*; la fermentación de azúcares que diferencia micoplasmas fermentadores de los no fermentadores y la hidrólisis de la arginina que diferencia especies que utilizan la vía arginina hidrolasa.

Existen también otras pruebas igualmente recomendadas por el Subcomité de Taxonomía de la Clase *Mollicutes*, aunque su valor es limitado. Entre dichas pruebas sobresalen las siguientes: reducción del tetrazolium, estudio de las acciones lipolíticas caracterizadas por la liberación de ácidos grasos (película) y acumulación de sus sales en cristales.

Perfiles de proteínas totales:

El conjunto de proteínas celulares es, tras su extracción, sometido a electroforesis, unidimensional o bidimensional en un gel de poliacrilamida que contienen también el agente desnaturizante SDS. De esta forma se obtienen perfiles característicos que sirven para el agrupamiento de las cepas objeto de estudio (Kersters y cols., 1994).

Pruebas serológicas:

Debido a la ausencia de pared celular, el crecimiento de los micoplasmas puede ser inhibido con anticuerpos específicos, lo que permite la identificación *in vitro* de los micoplasmas aislados. El principal problema en la preparación de los micoplasmas como inmunógenos es la absorción de proteínas procedentes del medio suplementado con suero animal. La otra consideración importante es que los antiseros son normalmente

producidos en conejos por ser un animal libre de micoplasmas, por lo que deben tener una alta calidad para obtener buenos resultados (Poveda & Nicholas, 1998).

Actualmente las pruebas serológicas más interesantes y específicas, orientadas a la determinación de antígenos de membrana en estos microorganismos están incluidas en dos grupos básicos. El primer grupo incluye procedimientos que trabajan con micoplasmas vivos: inhibición del crecimiento e inhibición del metabolismo; el segundo grupo puede actuar sobre organismos completos o sus antígenos: método de inmunofluorescencia. Estos métodos, tanto directos como indirectos, pueden variar en sensibilidad, especificidad y en su facilidad de montaje. Son técnicas rápidas en la identificación de los micoplasmas en condiciones diversas. El problema de estos métodos serológicos es que, además de ser muy laboriosos, presentan falta de especificidad y podrían dar lugar a resultados dudosos, debido a las reacciones cruzadas que se experimentan entre especies del género *Mycoplasma* (Poveda & Nicholas, 1998).

Estos métodos tradicionales de cultivo bacteriano se han caracterizado por ser sencillos, económicos y relativamente rápidos, sin embargo, la proporción de células bacterianas cultivables en medios convencionales oscila apenas entre el 0,1 y el 10 % de la población total, y consecuentemente se obtiene una visión incompleta de la diversidad bacteriana de la muestra.

Es por esto que técnicas de biología molecular tales como la PCR han dado lugar a un gran avance en la detección de estas bacterias y cuentan con la ventaja de ser específicas, sensibles y relativamente fáciles de realizar una vez puestas a punto, a lo que hay que añadir que se pueden obtener resultados definitivos en cuestión de horas.

Pero sin lugar a dudas, ha sido la comparación de las secuencias del gen ARNr 16S la técnica que mayor repercusión ha tenido en el estudio taxonómico y evolutivo de los micoplasmas y de las bacterias en general, y ha dado lugar al sistema de clasificación vigente (Rodicio & Mendoza, 2004).

Análisis molecular del gen ARNr 16S y de la región intergénica (ISR):

La utilidad de la secuencia del gen ARNr 16S como herramienta taxonómica ha sido ampliamente demostrada en bacterias y el análisis de las secuencias de dicho gen han redefinido las relaciones filogenéticas que con anterioridad eran demasiado dependientes del metabolismo celular (Woese & Fox, 1977; Woese, 1987; Fox y cols., 1980; Lane y cols., 1985; Young y cols., 2001).

Además de regiones altamente conservadas, utilizadas para el estudio de las relaciones entre taxones distantes, el ADNr 16S contiene regiones muy variables que se utilizan en la diferenciación de géneros y especies (Goebel y cols., 1987).

En procariotas, el *loci* del ADNr contiene los genes de los tres tipos de ARNr, 16S (*rrs*), 23S (*rrl*), y 5S (*rrf*). Estos genes están separados por regiones intergénicas muy distintas en tamaño y secuencia dependiendo de los géneros y especies. De entre ellas, la región intergénica *rrs-rrl* (ISR) es la más variable, al menos dos veces más que la del gen *rml* y cuatro veces más que la del gen *rrs*. Incluso dentro del genoma de una misma bacteria hay frecuentemente múltiples copias del operón *rrn* que poseen diversidad de tamaño y secuencia.

Posteriormente, Rodicio & Mendoza (2004) afirmaron que el estudio del gen ARNr 16S puede ser utilizado como cronómetro molecular por varias razones:

1. La molécula es muy antigua y está presente en todas las bacterias actuales.
2. Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios.
3. Su tamaño relativamente largo (1.500 nucleótidos) minimiza las fluctuaciones estadísticas.
4. La conservación en la estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, y aporta una base para el alineamiento preciso.
5. Su fácil secuenciación favorece bases de datos en continuo crecimiento.

Una vez determinada la secuencia de nucleótidos y establecidas las comparaciones, será el grado de similitud entre las secuencias de los ARNr 16S de dos bacterias lo que indique su relación evolutiva. Además, el análisis comparativo de secuencias permite construir árboles filogenéticos, que reflejan gráficamente la genealogía molecular de la bacteria y muestran su posición evolutiva en el contexto de los organismos comparados (Rodicio & Mendoza, 2004).

La región intergénica entre los genes ribosómicos 16S y 23S se ha utilizado últimamente para establecer relaciones filogenéticas entre microorganismos muy próximos. Esta región intergénica presenta la ventaja de encontrarse entre genes altamente conservados y por lo tanto es posible amplificarla en prácticamente cualquier microorganismo utilizando cebadores universales. El número de operones ribosómicos, y por lo tanto de ISR, presentes en los micoplasmas varía entre uno y dos, dependiendo de la especie. Estudios recientes han aprovechado la variabilidad de la longitud de esta

zona para estudiar y comparar la composición de microorganismos en diferentes hábitats (Rodicio & Mendoza, 2004).

Otro gran avance en la identificación de especies bacterianas ha sido la Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización (DGGE):

La electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización es una técnica de trazado molecular empleada en diversas disciplinas de la biología y de la química; consiste en la separación de ADN de doble cadena dependiendo de su punto de desnaturalización. Dicha desnaturalización se define en este caso como la separación de cadenas complementarias de ADN (McAuliffe y cols., 2003, 2005).

Esta técnica se desarrolló en un principio para detectar mutaciones puntuales en las secuencias en el ADN (Fisher & Lerman, 1983), pero las modificaciones para analizar poblaciones microbianas basadas en amplificaciones de fragmentos de genes ribosomales fueron descritas por Muyzer y cols. (1993). Este análisis de poblaciones microbianas se basa en que todas las especies bacterianas tienen un gen en común muy conservado (el gen ARNr 16S) y las variaciones en este gen definen grupos taxonómicos en las bacterias.

El fundamento teórico de esta técnica se basa en que un fragmento de ADN de doble cadena puede ser desnaturalizado por medios físicos (temperatura) o químicos (agentes desnaturalizantes como la urea o la formamida). El punto de desnaturalización del fragmento de ADN aumentará con el tamaño de la secuencia de nucleótidos que lo conforman, y también por la composición de nucleótidos de la secuencia, que suele aumentar con altos contenidos de guanina (G) y citosina (C). Cuando un fragmento de ADN de un determinado tamaño y secuencia se encuentra en las condiciones que

producen su desnaturalización, la migración de dichas cadenas en una electroforesis en gel se detiene o es considerablemente más lenta. Por tal motivo, dicha técnica utiliza un gradiente de desnaturalización durante la migración de fragmentos de ADN en un gel de electroforesis. Mediante esta técnica es posible convertir estados iniciales de ADN de doble cadena en estados de cadena sencilla desnaturalizada en algún punto de la migración para un fragmento de un tamaño y una secuencia específica (Lerman & Beldjord, 1999).

La aplicación de esta técnica en la identificación de micoplasmas fue llevada a cabo por McAuliffe y cols. (2003, 2005) que diferenciaron 67 especies de micoplasmas diferentes. Estos autores demostraron la especificidad de esta técnica, ya que consiguieron diferenciar especies como *Mycoplasma genitalium* y *Mycoplasma pneumoniae*, cuyo porcentaje de similitud del ADNr 16S es de un 98 % (Jensen y cols., 2003). Sin embargo, los perfiles de las especies *M. mycoides subsp. capri* y *M. mycoides subsp. mycoides LC* son indistinguibles, lo que indicó que no hay variación en la secuencia del ARNr 16S en la región V3 amplificada y, por consiguiente, reafirma la idea de que estas dos bacterias son de la misma especie (Pettersson y cols., 1996b).

Esta técnica también ha demostrado su eficacia en la identificación y diferenciación de 16 especies de micoplasmas aviares entre los que cabe destacar la diferenciación de *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma meleagridis* y *Mycoplasma iowae*. No obstante, *M. iowae* y *M. glycyphilum* tienen un perfil similar y *M. columbinum* y *M. columbinasale* aislados en palomas no pudieron ser diferenciados por esta técnica, aunque el estudio de la región intergénica ISR de estas bacterias muestra un 84 % de similitud (McAuliffe y cols., 2005).

Por otro lado, McAuliffe y cols. (2005) observaron que los perfiles de DGGE del *Mycoplasma gatae* aislado en gatos y el *Mycoplasma phocicerebrale* aislado en mamíferos marinos eran idénticos. Igualmente el perfil del *M. maculosum* aislado en cánidos es idéntico al perfil del *M. leopharyngis* aislado en leones. Otros micoplasmas que mostraron un mismo perfil de DGGE fueron *Mycoplasma canis* y *Mycoplasma edwardii* aislados en cánidos.

El análisis previo de las secuencias del gen ARNr 16S e ISR realizados en estos micoplasmas cuyo perfil de DGGE es idéntico muestra, en todos los casos, un alto grado de similitud genómica entre estas bacterias (Pettersson y cols., 2000, Chalker & Brownlie, 2004).

Las aplicaciones de esta técnica en estudios epidemiológicos de micoplasmas en aves silvestres han sido muy escasas, aunque Loria y cols. (2008) identificaron en un buitre leonado (*Gyps fulvus*) la presencia de *Mycoplasma gallinarum* y destacaron la utilidad de esta técnica, tanto para la identificación de micoplasmas desconocidos a partir de muestras clínicas como para la detección de infecciones múltiples de varios micoplasmas en aves silvestres.

Por último, cabe destacar que, en taxonomía clásica bacteriana, se define la especie bacteriana como el “conjunto de cepas que comparten una similitud del 70 % o más, en experimentos de hibridación ADN-ADN” y Stackebrandt & Goebel (1994) afirmaron que cepas con este nivel de relación presentan una identidad del 97 % o más entre sus genes ARNr 16S. Así, cepas con menos del 97 % de identidad en las secuencias de sus ADNr 16S es improbable que lleguen a estar relacionadas. Sin embargo, existen cepas que comparten una similitud inferior al 50 % en experimentos de hibridación, y son por tanto clasificadas en especies diferentes, pero presentan una identidad del 99 -

100 % en el ADNr 16S. Por ello, en taxonomía, actualmente se recomienda la identificación polifásica, ya que utiliza criterios fenotípicos junto con datos de secuenciación (Stackebrandt y cols., 2002).

I.3.2. Micoplasmas aviarios.

I.3.2.1. Evolución taxonómica.

Las primeras observaciones de estas bacterias en aves podrían deberse a Nelson (1936), quien las describe como cocobacilos Gram negativo en el exudado nasal de gallinas que presentaban una ligera coriza. Este autor señala a estas bacterias como las responsables del catarro de las gallinas y, más tarde, logra su crecimiento en cultivos tisulares y en Agar sangre.

Posteriormente a esta publicación, fueron muchos los autores que contribuyeron a establecer la presencia de micoplasmas en las infecciones respiratorias de las aves. De la Plane & Stuart (1943) y Van Herick & Eaton (1945) fueron capaces de cultivarlos en huevos embrionados y en medios artificiales, aunque no los relacionaron con la enfermedad crónica respiratoria de las aves.

Markhan & Wong (1952) y Van Roekel y cols. (1952) sugieren la posibilidad de que estas bacterias fueran las responsables de la enfermedad crónica de las aves y de la sinusitis del pavo.

En el año 1957, en la publicación de la 7ª edición del *Bergeys Manual of Determinative Bacteriology*, se inició la clasificación de estos organismos, en la que el género *Mycoplasma* se encuadró en la familia *Mycoplasmataceae* bajo el orden *Mycoplasmatales*, en la que la única especie aviar que aparece es *M. gallinarum*.

La posibilidad de la existencia de micoplasmas no patógenos en las aves fue descrita por Adler & Yamamoto (1957), Adler y cols. (1958) y Chu (1958), quienes pusieron de manifiesto la posibilidad de dos grupos distintos de micoplasmas; en el primer grupo se situarían los micoplasmas responsables de procesos clínicos y en el segundo aquellos cuya patogenia se desconoce. Estos micoplasmas fueron tipificados por estos autores en 5 serovars (I, II, III, IV, y V).

En 1960, Chalquest & Fabricant (1960), añaden el serovars ISD, identificado en pollos y pavos con infección sinovial, y en este mismo año Edward & Kanarek (1960) elevaron al rango de especie los micoplasmas *M. gallisepticum* y *M. iners*.

Olson y cols. (1964) proponen el nombre de *M. synoviae* para el microorganismo que Chalquest & Fabricant (1960) habían aislado como responsable de la sinovitis infecciosa, mientras que Roberts (1964) aísla en unos patos con sinusitis, un micoplasma que sería descrito como *M. anatis*. Yamamoto y cols. (1965) proponen el nombre de *M. meleagridis* para la cepa aislada por ellos mismos unos años antes, a partir de los sacos aéreos de unas crías de pavo.

En la 8ª edición del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Freundt (1974) describe dentro del género *Mycoplasma* las siguientes especies: *M. gallisepticum*, *M. anatis*, *M. synoviae*, *M. gallinarum*, *M. iners* y *M. meleagridis*.

M. columbinum y *M. columborale* fueron aislados a partir de 50 cepas obtenidas exclusivamente de palomas por Shimizu y cols. (1978). Posteriormente, Jordan y cols. (1982) describen como especie a *M. pullorum*, *M. gallinarum*, *M. gallopavonis*, *M. iowe* y *M. columbinasale*.

En la década de los 80, Freundt & Razin (1983) incluyen dentro del género *Mycoplasma*, en la 9ª edición de Bergey's, las siguientes especies aviares: *M. anatis*, *M. columbinasale*, *M. columbinum*, *M. columborale*, *M. gallinaceum*, *M. gallinarum*, *M. gallisepticum*, *M. gallopavonis*, *M. iners*, *M. iowae*, *M. meleagridis*, *M. pullorum* y *M. synoviae*.

Bolske & Morner (1981) detectan la presencia de micoplasmas en tres especies de ratoneros pertenecientes al Género *Buteo*, y los relacionan con signos de enfermedad respiratoria. Estos aislamientos de micoplasmas presentaban el mismo perfil bioquímico, y no mostraban similitud serológica con ninguna de las especies descritas hasta ese momento.

No obstante, fueron importantes las descripciones de Bradbury y cols. (1983, 1984, 1988a, b) que aislaron y caracterizaron muchos de los micoplasmas aviares que hoy conocemos, entre las que destaca la descripción del *M. glycyphilum* que puede causar mortalidad embrionaria en pollos. Posteriormente, estos autores identificaron el *M. anseris* en el falo de un ganso cuya patogenia no estaba del todo clara; en 1984 describen el *M. cloacale*, aislado en la cloaca de unos pavos y que posteriormente ha sido identificado en otras especies de aves silvestres.

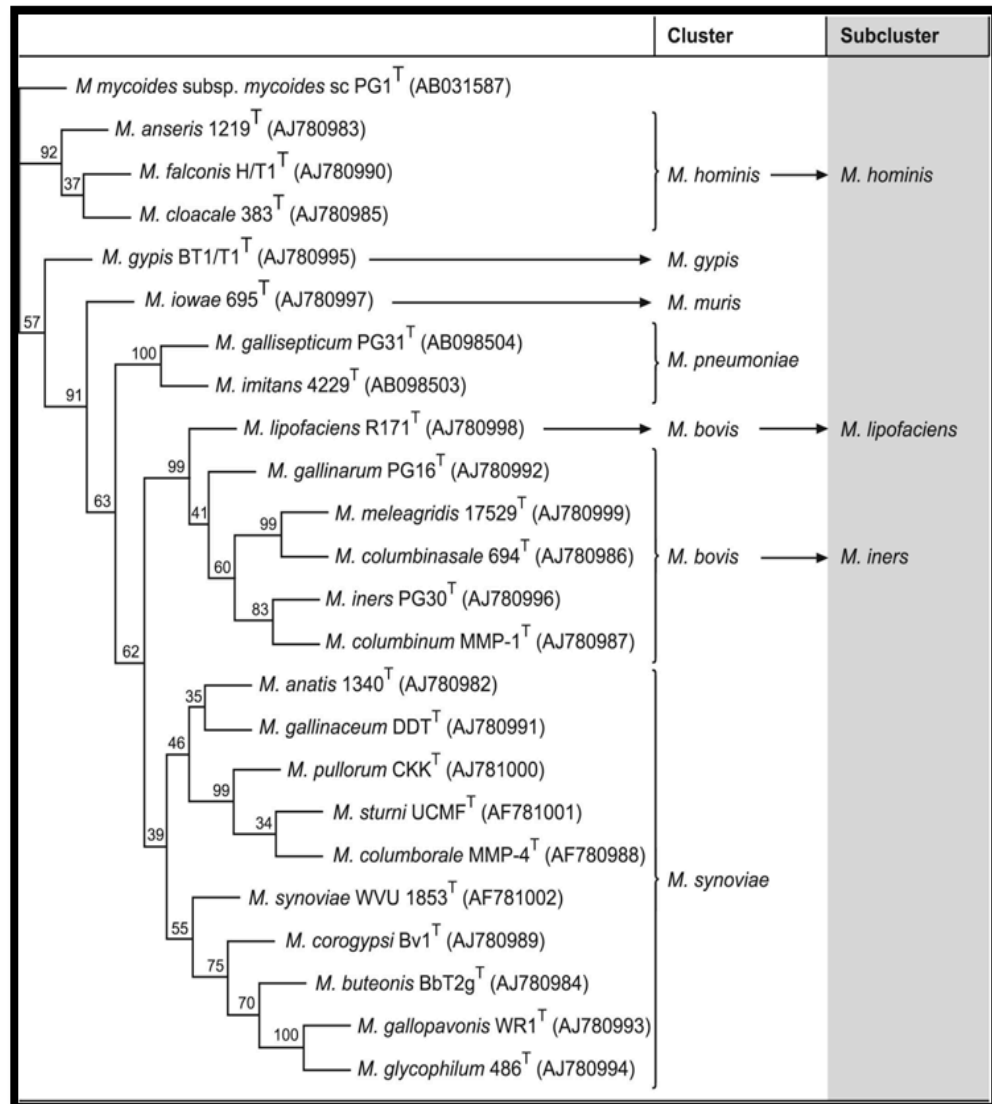
Otro micoplasma descrito por estos autores fue *M. lipofaciens* en el año 1983, aislado a partir de muestras de pollos, patos y pavos. Posteriormente, esta bacteria ha sido aislada en huevos de aves rapaces por Lierz y cols. (2007b). Investigaciones posteriores sugieren que *M. lipofaciens* (cepa ML64) puede transmitirse a humanos y causar signos clínicos (Lierz y cols., 2008b).

Otros estudios destacables en la taxonomía de los micoplasmas en aves silvestres fueron realizados por Poveda y cols. (1990b, 1990b) que identificaron nuevos micoplasmas en varias especies de aves rapaces, que posteriormente fueron caracterizados como nuevas especies del Género *Mycoplasma* con los nombres de *M. falconis*, *M. buteonis* y *M. gypis* (Poveda y cols., 1994).

Más tarde, Bradbury y cols. (1993) demostraron, mediante técnicas de biología molecular, que unos hallazgos, inicialmente caracterizados como *M. gallisepticum* aislados en patos y gansos en el sur de Francia, eran otra especie distinta, más concretamente, *M. imitans*. Estudios preliminares demostraron la patogenia de esta bacteria.

Los estudios en los que se describe la presencia de nuevos micoplasmas en aves silvestres han continuado, y podríamos destacar en los últimos años la descripción por Forsyth y cols. (1996) de *M. sturni*, aislado en un estornino pinto (*Sturnus vulgaris*) que sufría un cuadro de conjuntivitis bilateral. En ese mismo, Panangala y cols. (1996) describen el *M. corogypsi* como una especie de micoplasma que había sido aislado en el absceso de un zopilote común (*Coragyps atratus*) y posteriormente en una poliartritis de otro zopilote por Ruder y cols. (2009).

Árbol filogenético basado en el estudio de la región intergénica (ISR) de todos los micoplasmas aviares (Ramírez y cols., 2008):



I.3.2.2. Micoplasmas aviaries patógenos.

El estudio de las enfermedades que afectan a las aves domésticas es cada vez más importante, ya que el consumo de carne de pollo se incrementa cada año y, hoy por hoy, es la carne más consumida después de la de cerdo. La intensificación de las producciones aviaries ha posibilitado el incremento de las enfermedades y la disminución de la rentabilidad de las explotaciones afectadas (Lobo y cols., 2002).

Por poner un ejemplo, solo en Gran Canaria existe una treintena de explotaciones industriales de ponedoras y doce productoras de pollos *broilers*. El tamaño de estas granjas es muy variable, y el número de gallinas ponedoras oscila entre 2.000 y 90.000; en el caso de las explotaciones de pollos *broilers* entre 3.000 y 175.000. En estos datos no están contabilizadas las explotaciones pequeñas o ecológicas, con unos 800 animales aproximadamente que están fuera de las ADS avícolas.

En este sentido, las infecciones provocadas por micoplasmas continúan siendo una de las causas más importantes de la pérdida de productividad de la industria avícola (Kleven, 1990). Destaca el síndrome respiratorio crónico, que produce grandes pérdidas económicas de forma directa e indirecta. Su etiología es compleja y multifactorial, y los micoplasmas, en particular *M. gallisepticum* y *M. synoviae*, son reconocidos como los de mayor importancia en la participación de la etiopatogenia de esta entidad (Lobo y cols., 2002).

La repercusión patológica de estos micoplasmas depende sobre todo del nivel de contagio, de las situaciones de estrés, de las vacunaciones frente a virus de tipo respiratorio y del momento fisiológico en el que penetren en las aves (Pagés-Manté, 2005).

La transmisión vertical se ha reducido muchísimo mediante los planes de bioseguridad establecidos en incubadoras o reproductoras y la existencia de vacunas vivas que nos pueden ayudar a controlar estas enfermedades bacterianas (Bradbury, 1998).

I.3.2.2.1 Aspectos clínicos.

a) Mycoplasma gallisepticum (Mg).

Mycoplasma gallisepticum (Mg) produce una de las enfermedades crónicas respiratorias más importantes en pollos y sinusitis en pavos (Ley, 2008). Estos micoplasmas aumentan la susceptibilidad en las aves infectadas de padecer infecciones secundarias que por lo general afectan a su producción de huevos y a los nacimientos de pollos, lo que da lugar a enormes pérdidas económicas en la industria avícola (Keeler y cols., 1996).

Las aves de corral infectadas pueden no presentar síntomas o mostrar signos clínicos respiratorios obvios como coriza, conjuntivitis, tos y estornudos. Puede ocurrir también que los animales presenten una exudación nasal, estertores traqueales y soplos a través del pico parcialmente abierto (Bencina y cols., 2003).

También puede ser característica en los pavos una sinusitis uni o bilateral, y los senos infraorbitales pueden estar tan hinchados que los párpados lleguen a cerrarse. La conjuntivitis con exudado ocular espumoso es también una característica común en aves silvestres y a veces en pollos con (Mg), que a menudo se manchan las plumas de las alas como resultado de los intentos de eliminar el exudado de los ojos (Bradbury, 1999).

En algunas circunstancias, (Mg) se puede asociar a enfermedades respiratorias agudas en pollos y pavos, especialmente en ejemplares jóvenes, aunque es el pavo, el ave más susceptible. La gravedad de la enfermedad viene determinada por el grado de infección secundaria con virus tales como el de Newcastle y el de la bronquitis infecciosa (VBI), así como con bacterias tales como *Escherichia coli* (Bradbury, 1998).

En pavos existe una sinergia con la infección por neumovirus aviar (APV) que puede producir signos clínicos respiratorios como tos, estornudos o inflamación de la cabeza, que conducen al síndrome respiratorio conocido como síndrome de cabeza hinchada (Bradbury, 1999).

Las lesiones del tracto respiratorio se manifiestan al principio con un exudado mucoso excesivo y después con exudación catarral caseosa, que pueden formar masas amorfas en los sacos aéreos (Bradbury, 1998). En pavos y aves silvestres, los senos infraorbitales hinchados contienen una exudación mucosa o caseosa (Bencina y cols., 2003).

La enfermedad por (Mg) en pollos puede parecer un problema respiratorio causado por otros patógenos como cepas de baja virulencia de la enfermedad de Newcastle y la Bronquitis Infecciosa Aviar. Estas se pueden presentar en infecciones mixtas con (Mg). También deberían descartarse infecciones con *Haemophilus paragallinarum*, *Pasteurella multocida* y *M. synoviae*. En pavos, (Mg) se puede confundir con infecciones por APV y la presencia de sinusitis también puede sugerir infección con *Pasteurella multocida*, *Chlamydia* o *Mycoplasma synoviae* (Bradbury, 1999).

b) Mycoplasma meleagridis (Mm).

Las infecciones producidas por (Mm) están extendidas en todo el mundo, y en la mayoría de los casos es un patógeno específico de los pavos que se encuentra comúnmente en el tracto respiratorio y/o reproductor (Jordan, 1990).

Los signos clínicos observados en las granjas con infecciones por (Mm) son: retraso en el crecimiento, aerosaculitis y osteodistrofia, además de reducción en el número de nacimientos de los pollos (Stipkovits & Kempf, 1996).

Esta bacteria puede permanecer en la cloaca, bolsa de Fabricio de los pollos, oviducto o en el tracto respiratorio superior de las aves adultas, sin provocar sintomatología; en estas condiciones puede sobrevivir en el organismo durante meses (Jordan, 1990) y tener un efecto inmunosupresor en las aves jóvenes, con afectación de los sacos aéreos (Bradbury, 1998).

Las lesiones más importantes observadas en los pavos de un día son aerosaculitis torácica con engrosamiento de la mucosa y exudado caseoso. A medida que aumenta la edad de estos animales, podemos observar que las aerosaculitis se alejan y, a las tres semanas de vida, estas lesiones se pueden extender hasta los sacos aéreos abdominales sin que se observe sinusitis (Hoffman y cols., 1997).

c) *Mycoplasma iowae* (Mi).

Mycoplasma iowae (Mi) es un micoplasma aviar que posee propiedades diferentes a otros micoplasmas aviares tales como resistencia a las sales biliares, predilección por el tracto gastrointestinal y una resistencia relativa a numerosos compuestos antimicrobianos. Las cepas que pertenecen a esta especie tienen también un elevado y poco común grado de variación antigénica (Bradbury & Kleven, 2008).

Este micoplasma se ha aislado en varias especies aviares, y en las infecciones naturales su principal manifestación es la mortalidad de embriones de pavo en las últimas etapas de la incubación (Al-Ankari & Bradbury, 1996).

Por otro lado, las infecciones experimentales con (Mi) en pavos reproductores provocaron mortalidad embrionaria tardía, disminución del 5 % en la incubabilidad y anomalías en la descendencia (Trampel & Goll, 1994; Bradbury & Kleven, 2008).

En pollos y pavos infectados con (Mi) se observó aerosaculitis, tenosinovitis, artritis, rotura de los tendones flexores de los dedos, rotación de la tibia y erosión en los cartílagos articulares (Trampel & Goll, 1994; Bradbury & Kleven, 2008). A raíz de las infecciones experimentales en pollos de un día, este micoplasma causó retraso en el crecimiento, plumaje de mala calidad y condrodistrofia en ambas patas (Bradbury y cols., 1988a).

La infección en huevos de gallina causó una enfermedad generalizada en los pollos nacidos y una elevada mortalidad. Las dos únicas aves que sobrevivieron desarrollaron condrodistrofia hasta la tercera semana de edad (Bradbury y cols., 1988a).

d) *Mycoplasma synoviae* (Ms).

Mycoplasma synoviae (Ms) también afecta a los pollos y pavos, y junto con (Mg), es una de las principales preocupaciones de la industria avícola (Kleven, 2003). La principal manifestación clínica que produce es sinovitis, principalmente en las articulaciones del tarso y en las almohadillas, además algunas aves pueden mostrar una infección generalizada (Kleven y cols., 1972).

I.3.2.2.2. Epidemiología.

Los micoplasmas patógenos, debido a su limitado material genético y su frágil naturaleza, se han asegurado su propia supervivencia utilizando diferentes métodos de propagación, de manera que pueden transmitirse de padres a la descendencia a través del huevo y de ave a ave por contacto directo o indirecto, sin embargo, las rutas exactas de la difusión indirecta no están bien documentadas (Bradbury, 1998).

A pesar de que estos microorganismos no sobreviven bien fuera del hospedador, todavía se suceden infecciones inexplicables por micoplasmas en lotes libres y aparentemente bajo buenas condiciones de bioseguridad. En muchos casos, el origen no se identifica nunca. Una posibilidad es que los micoplasmas sean introducidos en estos lotes por otras aves u otros animales, los cuales podrían actuar como hospedadores intermediarios o como vectores mecánicos (Jordan, 1990).

I.3.2.2.3. Diagnóstico.

Los métodos empleados en el diagnóstico de las micoplasmosis aviarias se pueden resumir en:

Cultivo: Se toman muestras de aves vivas, de cadáveres frescos, de cadáveres de aves que fueron congelados cuando estaban frescos e incluso de embriones muertos dentro del huevo o de pollos que han roto la cáscara pero que no lograron salir.

En aves vivas, se pueden tomar muestras en la coana, orofaringe, esófago, tráquea, cloaca y falo. En las aves muertas, las muestras deben obtenerse de la cavidad nasal, seno infraorbital, tráquea o sacos aéreos. Los exudados se pueden aspirar de los senos infraorbitales y de las cavidades articulares. Las muestras también se pueden tomar de huevos embrionados, por ejemplo de la superficie interna de la membrana vitelina, y de la orofaringe y sacos aéreos. Todo debe examinarse tan pronto como sea posible después de su recogida (Bradbury, 1998).

Métodos inmunológicos: Los procedimientos de inmunofluorescencia para diagnóstico se aplican generalmente en el laboratorio a los aislamientos sospechosos. Esto se debe a que los organismos son demasiado pequeños para reconocerlos de modo concluyente bajo microscopía óptica y a que es improbable poder disponer de los correspondientes controles negativos y positivos del exudado o tejido. Las técnicas inmunológicas van desde pruebas de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos hasta pruebas indirectas de la inmunoperoxidasa o la prueba de inhibición del crecimiento (Bradbury, 1998).

Métodos de reconocimiento por PCR: esta técnica es capaz de generar *in vitro* grandes cantidades de un determinado fragmento de ADN, a partir de cantidades mínimas del mismo. La PCR se caracteriza por su sensibilidad, versatilidad, sencillez y tan solo requiere el uso de dos cebadores oligonucleotídicos “primer” complementarios a las secuencias situadas en los extremos del fragmento de ADN que se desea amplificar. La técnica se basa en el desarrollo de ciclos repetidos de desnaturalización de la doble hebra por calor, la hibridación de los dos cebadores a sus secuencias complementarias y la síntesis de ADN gracias a la acción de una ADN polimerasa. Los cebadores sirven para definir los extremos del seguimiento del ADN que se desea amplificar.

Pruebas serológicas: son pruebas de uso corriente pero que pueden carecer de especificidad y/o sensibilidad; se aconseja su uso para el diagnóstico de enfermedades en grandes grupos de aves. Quienes deseen usar dichas pruebas para diagnóstico deben tener en cuenta que han de establecer el ensayo de sensibilidad y especificidad en las condiciones propias de su laboratorio. Debería también resaltarse que estas pruebas no han sido validadas para ser usadas con sueros de aves silvestres. Las pruebas serológicas más utilizadas son la prueba rápida de aglutinación sérica y la prueba de la inhibición de la hemaglutinación (Bradbury, 1998).

I.3.2.2.4. Tratamiento.

Los antibióticos que se utilizan en la prevención y tratamiento de las micoplasmosis aviarias pertenecen al grupo de los macrólidos (Tilosinas, Eritromicina, Tiamulina, Tilmicosina, Josamicina, Lincomicina - espectinomina, Espiramicina y la Kitasamicina), que actúan inhibiendo la síntesis proteica de los micoplasmas sensibles.

Para el tratamiento y control de los micoplasmas a través de antibióticos se debe tener en cuenta que, aunque tienen una gran capacidad de difusión, necesitan de varias semanas de colonización para causar lesiones serias en las aves. El objetivo del tratamiento con antibióticos es mantener una carga mínima de micoplasmas, de esta manera, se logra que el ave los controle y disminuyan así los efectos negativos (Kleven, 2001).

I.3.2.2.5. Control y profilaxis.

El control de los micoplasmas aviarios patógenos consiste, a grandes rasgos, en mantener las granjas libres de la infección mediante la utilización de medicamentos y las vacunaciones periódicas. En teoría, la difusión de micoplasmas entre los lotes debería ser relativamente fácil de controlar mediante estrictas medidas de bioseguridad porque la transmisión necesita un estrecho contacto, además los micoplasmas no sobreviven bien en el ambiente y pueden ser fácilmente destruidos por desinfectantes habituales (Bradbury, 1998).

Los lotes infectados pueden ser tratados con antibióticos, no solo para aliviar la enfermedad, sino también para reducir el número de micoplasmas que son excretados por las aves. Estos medicamentos pueden ser de gran utilidad en la prevención de los signos clínicos y de las lesiones, así como de las pérdidas económicas, aunque no se pueden utilizar para eliminar la infección en un lote y no es una solución satisfactoria a largo plazo (Bradbury, 1998).

A pesar de la disponibilidad de vacunas, el uso de antimicrobianos sigue siendo el método más económico de control de estas infecciones en aquellos lugares donde las enfermedades siguen siendo endémicas (Stipkovits y cols., 1993).

Debe tenerse en cuenta que en muchos casos hay infecciones conjuntas de (Mg) y (Ms), por lo cual, si vacunamos solamente contra un tipo de micoplasma con vacunas vivas, y las aves son infectadas por el otro, no tendrán protección contra este, y se complicará la medicación de las aves si no queremos eliminar el micoplasma vacunal (Kleven, 2008).

Parece probable que las personas y/o sus ropas puedan actuar como portadoras de micoplasmas aviáres. Algunos estudios demuestran que (Mg) podría sobrevivir en materiales de algodón más de cuatro días, incluso una cepa de (Mg) sobrevivió 24 horas en la nariz de una persona (Christensen y cols., 1994). Más recientemente se han utilizado métodos moleculares para investigar la presencia de (Mg) y (Ms) en el ambiente (Marois y cols., 2002a, 2002b).

I.3.2.3. Micoplasmas aislados en aves silvestres.

I.3.2.3.1. Micoplasmas patógenos.

Una amplia variedad de trabajos científicos ha descrito el papel de los micoplasmas patógenos en aves silvestres y la forma en que estas pueden actuar como portadoras de dichas bacterias (Lierz y cols., 2000a).

M. gallisepticum es sin duda uno de los micoplasmas mejor estudiados por su patogenicidad y ha sido aislado en varias especies de aves silvestres como en las *Galliformes*

(Bencina y cols., 2003), *Anseriformes* (Ibrahim y cols., 2000), *Psittaciformes* (Bozeman y cols., 1984), *Columbiformes* (Bencina y cols., 1987a), *Paseriformes* (Dhondt y cols., 1998; Hartup y cols., 1998; Mikaelian y cols., 2001). Incluso se han detectado infecciones en aves rapaces que podrían deberse al consumo de carcasas con las que son alimentadas, sin embargo, son necesarios más estudios para demostrar esta hipótesis (Poveda y cols., 1990a, 1990b; Morishita y cols., 1997; Lierz y cols., 2002, 2008a).

En la década de los 90, se observó la presencia de *M. gallisepticum* en multitud de especies de paseriformes en Estados Unidos (Ley y cols., 1996; Luttrell y cols., 1996; Fischer, 1997; Hartup y cols., 2001). La mayoría de estas aves eran pinzones que presentaban un cuadro de conjuntivitis, descargas nasales y oculares e inflamación de los párpados. La tipificación molecular de estas cepas fue útil para ilustrar que eran similares entre sí, pero no había relaciones próximas con las cepas vacunales o las cepas aisladas en las industrias de avicultura local (Ley y cols., 1997). En estos estudios se observó que los aislamientos de una misma cepa podrían influir en la capacidad de causar enfermedad en diferentes especies y que había una amplia variedad de especies aviarias silvestres que tenían anticuerpos contra (Mg), aunque estas cepas no causaron una enfermedad significativa en infecciones experimentales con pollos domésticos.

En el Reino Unido, se han detectado por PCR signos de la infección por (Mg) en cuervos (*Corvus corax*), a pesar de que no hay evidencias de transmisión directa entre estas aves silvestres y lotes avícolas (Pennycott y cols., 2005). En otras ocasiones se ha detectado la presencia de (Mg) en procesos de sinusitis unilaterales o bilaterales, particularmente en pavos silvestres.

No está del todo claro el papel de *M. synoviae* y *M. meleagridis* en las enfermedades respiratorias en aves silvestres, pero se han detectado anticuerpos de

estas bacterias en pavos silvestres en un estudio realizado al oeste de los Estados Unidos. *M. synoviae* no solo ha sido descrito en faisanes, perdices, codornices, gallinas de guinea, patos, gansos y palomas sino también en gorriones comunes (*Passer domesticus*) que vivían cerca de granjas infectadas por este micoplasma (Poveda y cols., 1990a).

Posteriormente los métodos de tipificación molecular demostraron que las cepas de (Ms) de faisanes silvestres eran diferentes de las cepas comunes avícolas (Hammond y cols., 2004).

Por otra parte, *M. meleagridis* se ha aislado en codornices y pavos reales (*Pavo cristatus*) por Simecka y cols. (1992) y también hay descripciones en halcones gerifalte (*Falco rusticolus*) en el Oriente Medio por Lierz y cols. (2002).

M. iowae, que generalmente se encuentra en pavos, ha sido aislado también en diferentes aves silvestres como los gansos (Lin y cols., 1995) y amazonas de nuca amarilla (*Amazona ochrocephala auropalliata*) (Amin, 1977; Bozeman y cols., 1984), pero su importancia en estos casos no quedó del todo clara.

I.3.2.3.2. Micoplasmas de patogenia incierta.

Anteriormente se han descritos los casos en los que los micoplasmas patógenos pueden causar diferentes síntomas en aves silvestres, pero existe una amplia variedad de micoplasmas que han sido aislados y/o descritos en aves silvestres sin conocer hasta qué punto podrían causar patologías.

En este sentido cabe destacar la alta prevalencia de estos micoplasmas en aves rapaces (Panangala y cols., 1993; Poveda y cols., 1990a,b,1994; Morishita y cols., 1997; Lierz y cols., 2000a, 2002, 2007a; Oaks y cols., 2004) y el alto número de aislamientos de estas bacterias en huevos y semen de estas aves (Lierz y cols., 2007a).

La presencia de micoplasmas en aves rapaces resulta muy interesante, ya que estos animales poseen unos hábitos muy próximos a los humanos y muchos de ellos habitan cerca de las granjas y se alimentan de roedores como los ratoneros comunes (*Buteo buteo*) o los cernícalos vulgares (*Falco tinnunculus*) o directamente cazan aves de corral como el gavilán común (*Accipiter nissus*), el azor (*Accipiter gentilis*) o el halcón peregrino (*Falco peregrinus*) (Lierz y cols., 2008a).

Existen otros grupos de aves como las psitácidas, en los que se incluyen los micoplasmas como posibles agentes causantes de enfermedades crónicas respiratorias, pero su cultivo y aislamiento, bastante complicado, solo ha obteniendo resultados positivos a través de técnicas de PCR (Lierz & Hafez, 2009).

A pesar de esto, hoy por hoy se conoce muy poco sobre la prevalencia, patogenia y distribución de los micoplasmas en aves silvestres.

Relación de los micoplasmas aviáres descritos en aves silvestres:

Mycoplasma anatis.

Este microorganismo, identificado en unos patos domésticos, fue descrito por Walker & Bannister (1953) en Canadá y desde entonces, son muchos los estudios, sobre todo en Europa, en los que se describe la presencia de este micoplasma tanto en patos domésticos como silvestres.

En 1988, se observó en Hungría, un caso en el que un pato doméstico padecía una afección del sistema nervioso central asociado a la presencia de *M. anatis* (Ivanics y cols., 1988). Estudios posteriores confirmaron la presencia de este micoplasma en muchas especies de patos silvestres como el ánade real (*Anas platyrhynchos*), ánade sombrío (*Anas rubripes*) y ánade friso (*Anas strepera*) (Poveda y cols., 1990a; Goldberg y cols., 1995). En ambos artículos se plantea la posibilidad de que el *M. anatis* pueda influir en la muerte de estos animales y se advierte del efecto sinérgico con otras infecciones.

Poveda y cols. (1990a) aislaron en España este microorganismo a partir de una muestra tomada en un halcón sacre (*Falco cherrug*) que presentaba respiración irregular y sibilante con secreción mucosa en las narinas que se había complicado con un cuadro de anorexia y pérdida del apetito.

Posteriormente, en una inoculación experimental de este micoplasma en un huevo de ánade real (*Anas platyrhynchos*), se observó: reducción en la eclosión de huevos, disminución en el tamaño de los neonatos y progresión escasa del crecimiento de los pollos (Samuel y cols., 1995).

En el año 1997, Wobeser (1997) aisló este micoplasma en muchos patos enfermos, así como en casos de muertes embrionarias o en pollos de lento crecimiento sin que quedase claro el papel principal de esta bacteria en la patogenia.

Estudios serológicos realizados en España detectaron bajos niveles de anticuerpos de *M. anatis* en muchas especies de aves acuáticas como la garceta común (*Egretta garzetta*), la espátula común (*Platalea leucorodia*) y la avoceta común (*Recurvirostra avosetta*) (Astorga y cols., 1994).

Todos estos trabajos describen que *M. anatis* podría ser patógeno para los patos domésticos aunque su efecto en las poblaciones de patos silvestres son inciertas, y se hace necesario realizar más estudios (Luttrel & Fischer, 2007).

Mycoplasma anseris.

M. anseris (cepa silvestre 1220^T) fue descrito por primera vez en Hungría por Bradbury y cols. (1988b) a partir del falo de un ganso doméstico, y más tarde fue aislado por Stipkovits y cols. (1987). En ambos casos los animales padecían salpingitis o inflamación del falo.

Stipkovits y cols. (1987) demostraron que la cepa de referencia de *M. anseris* (1220^T) era patógena para embriones de gallina, y en una infección experimental se observó un descenso en la producción de huevos, aumento de la infertilidad y de la mortalidad de los embriones, aerosaculitis, peritonitis y aumento de la tasa de reducción del crecimiento de la progenie.

Mycoplasma buteonis.

Este microorganismo fue descrito, por primera vez, en siete aves de la especie ratonero común (*Buteo buteo*) por Poveda y cols. (1994) en las que no se apreciaron síntomas de enfermedad aparente, sin embargo, esta bacteria se identificó mediante técnicas serológicas *immunoblotting* en un pollo de halcón sacre (*Falco cherrug*) que padecía un cuadro con perosis y deformidad en la epífisis del hueso tarso metatarso sin que hubiera otro tipo de crecimiento bacteriano en dicha lesión (Erdélyi y cols., 1999).

En estudios posteriores se aisló esta bacteria en un halcón sacre (*Falco cherrug*) y en un halcón gerifalte (*Falco rusticolus*) sin sintomatología aparente, pero los autores de este estudio, Lierz y cols. (2000, 2002), sugieren que *M. buteonis* podría tener un efecto patógeno potencial.

En 2008, se estudió el papel de este micoplasma en el proyecto de recuperación del cernícalo primilla (*Falco naumanni*) y se observó su presencia en dos aves y en otra cautiva que estaba dentro de un programa de cría (Lierz y cols., 2008d).

Mycoplasma cloacale.

Este micoplasma fue descrito por primera vez en Gran Bretaña (Bradbury & Forrest, 1984) y fue aislado a partir de la cloaca de un pavo de corral (*Meleagris gallopavo*). En este mismo estudio se detalla que esta bacteria podría causar mortalidad en embriones de pavos pero los experimentos no fueron concluyentes. Al año siguiente, Stipkovits y cols. (1985) confirmaron la presencia de este micoplasma en un pato cuyo falo presentaba un proceso inflamatorio.

Posteriormente este microorganismo fue descrito en otras especies de aves, como en el pavo salvaje (*Meleagris gallopavo*), el porrón moñudo (*Aythya fuligula*), el porrón europeo (*Aythya ferina*), la alondra común (*Alauda arvensis*), el estornino pinto (*Sturnus vulgaris*), las ninfas (*Nymphicus hollandicus*), el pájaro picapinos (*Deudrocopos minor*), el pato mudo (*Cairina moschata*), el ánade real (*Anas platyrhynchos*) y en el falo de tres gansos comunes (*Anser anser*), con lo que se demostró la poca especificidad de esta bacteria por un hospedador en concreto (Bradbury y cols., 1987).

Mycoplasma columborale, *Mycoplasma columbinun* y *M. columbinasale*.

M. columborale, *M. columbinum* y *M. columbinasale* fueron descritos por Shimizu y cols. (1978) a partir de muestras de palomas. Posteriormente han sido aislados en otros trabajos en los que se describe que algunos ejemplares de palomas bravías (*Columba livia*) presentaban sintomatología clínica con trastornos respiratorios y lesiones oculares (Jordan y cols., 1981; MacOwan y cols., 1981; Bencina y cols., 1987a; Nagatomo y cols., 1997; Esposito, 2000; Loria y cols., 2005). En otras ocasiones estos aislamientos provenían de palomas totalmente sanas (Kleven, 2003).

No obstante, Poveda y cols., (1990a) aislaron *M. columborale* en los sacos aéreos de un halcón peregrino (*Falco peregrinus*) con síntomas respiratorios.

Mycoplasma corogypsi.

Este microorganismo fue aislado por primera vez en un zopilote común (*Coragyps atratus*) y más concretamente en el absceso de una de sus patas por Panangala y cols., (1993). Estos buitres se encuentran en América del Norte y en este

primer trabajo no se encontró relación entre la presencia del micoplasma y el proceso clínico.

En el año 2002, esta bacteria fue aislada en Europa a partir de la tráquea de un halcón peregrino (*Falco peregrinus*), en un halcón sacre (*Falco cherrug*) y en halcones híbridos que no presentaban sintomatología clínica por Lierz y cols. (2002).

En el año 2009, Ruder y cols. (2009) detectaron mediante la secuenciación del gen ARNr 16S la presencia de este microorganismo en un ave de la misma especie que sufría una grave intoxicación por plomo y que presentaba una poliartritis severa.

Mycoplasma falconis.

Este micoplasma, junto con *M. gypis* y *M. buteonis*, se describió por primera vez en dos halcones sacre (*Falco cherrug*) en los que no se apreció síntomas de enfermedad aparente (Poveda y cols., 1994).

En el año 2002 se observó la presencia de *M. falconis* junto con *M. meleagridis* en el 25 % de los halcones gerifalte (*Falco rusticolus*) en un estudio realizado en Alemania por Lierz y cols. (2002). En 2008 se observa que más del 70 % de los adultos y un 69,2 % de los pollos volanderos del proyecto de cría en cautividad del cernícalo primilla (*Falco naumanni*) eran positivos de *M. falconis* (Lierz y cols., 2008d).

Mycoplasma gallinaceum.

Este micoplasma se detecta normalmente en la industria avícola y son pocos los estudios en los que se ha descrito su presencia en aves silvestres. Uno de estos estudios

realizados en aves silvestres fue descrito en España por Poveda y cols., (1990a) que lo aíslan en un faisán dorado (*Chrysolophus pictus*), en dos palomas bravías (*Columba livia*) y en un halcón peregrino (*Falco peregrinus*) con problemas respiratorios y sinusitis.

Más tarde, se identificó mediante técnicas serológicas *immunoblotting* este micoplasma en seis pavos silvestres (*Meleagris gallopavo*) que no presentaban sintomatología clínica (Hoffman y cols., 1997).

Mycoplasma gallinarum.

Existe una amplia distribución de esta bacteria que ha sido aislada en el sistema respiratorio de pollos y pavos de corral (Shimizu y cols., 1979) así en cultivos de fibroblastos en gansos domésticos (Stipkovits y cols., 1975), gallinas japonesas (*Gallus domesticus*), perdices de bambú (*Bambuskola thoracka*), gorriones comunes (*Passer domesticus*), cisnes (*Cygnus bewikii*), grullas damiselas (*Antropoides virgo*) (Shimizu y cols., 1979) y su presencia en las palomas es muy común (Reece y cols., 1986).

Pero fue en el año 1990, cuando se observó que este micoplasma está relacionado con problemas en la incubación de huevos de gallina (Martin de Las Mulas y cols., 1990) y en este mismo año Poveda y cols. (1990a) lo identificaron en un buitre negro (*Aegypius monachus*) con afección del parénquima pulmonar y en un halcón peregrino (*Falco peregrinus*) aparentemente sano.

Posteriormente, en el Proyecto de Reintroducción del Buitre leonado (*Gyps fulvus*) en Sicilia, se detectó, mediante la técnica DGGE, la presencia de este micoplasma en el cadáver de un Buitre leonado que había padecido un amplio periodo letárgico con anorexia (Loria y cols., 2008).

Mycoplasma gallopavonis.

Este micoplasma es considerado una bacteria saprofita en pavos salvajes (*Meleagris gallopavo*) aparentemente saludables (Cobb y cols., 1992; Luttrell y cols., 1992), aunque se ha observado, en infecciones experimentales, que es letal para embriones de pollos y pavos domésticos (Rocke & Yuill, 1987).

Mycoplasma glycyphilum.

El primer aislamiento de *M. glycyphilum* (cepa 486) fue aislado a partir del oviducto de una gallina adulta. Estudios preliminares sobre su patogenia indicaron que esta bacteria podría causar mortalidad embrionaria y alteraciones en la incubación de los huevos, así como retraso en el crecimiento de los pollos de gallina. En este primer artículo también se expone que esta bacteria muestra una predilección por el tracto digestivo de las aves, sin embargo, los estudios realizados en embriones de pavo no fueron concluyentes (Forrest & Bradbury, 1984).

Posteriormente se ha detectado en varias ocasiones la presencia de este micoplasma en aves silvestres (Bencina y cols., 1987a, b) y en el año 2001 se describe en faisanes con problemas respiratorios y conjuntivitis, en los que también se detectó la presencia de *Pasteurella multocida* (Chin & Goshgarian, 2001). En 2008 se aísla un micoplasma muy similar a esta bacteria según el estudio del gen ARNr 16S en un buitre leonado (*Gyps fulvus*) por Loria y cols. (2008).

Mycoplasma gypis.

Este micoplasma fue descrito por primera vez en un buitre leonado (*Gyps fulvus*) con problemas respiratorios por Poveda y cols. (1994) y desde su descubrimiento ha sido aislado en diferentes especies de aves silvestres. Destaca el trabajo de Schimidt y cols. (2009), que detectan la presencia de *M. gypis* en el 38 % de las coanas de la especie alcaraván común (*Burhinus oedicephalus*) en las que también se detectó la existencia de *M. falconis*. El objetivo de este estudio fue investigar hasta qué punto estos animales eran portadores capaces de provocar enfermedades en los halcones de los jeques árabes.

Mycoplasma imitans.

Este micoplasma fue aislado por primera vez en Francia a partir de una muestra obtenida en los cornetes de un pato y denominado *M. imitans* cepa 4229^T por Dupiellet (1984). Posteriormente otra cepa diferente (B2/85) de este micoplasma fue aislada en un ganso y en una perdiz roja en Gran Bretaña por Bunts y cols. (1986).

En un principio, todos estos aislamientos fueron identificados como *M. gallisepticum* por las técnicas de inmunofluorescencia e inhibición del crecimiento, ya que las características fenotípicas eran similares; sin embargo Bradbury y cols. (1993) demostraron con las técnicas de SDS PAGE y *restricción enzyme analysis data for the DNAs* que eran bacterias diferentes, de hecho su parecido con *M. gallisepticum* puede causar problemas en las pruebas serológicas en programas de identificación de esta bacteria.

Posteriormente algunos estudios describieron que la cepa 4229^T puede causar una importante reducción del crecimiento de los embriones, aerosaculitis en los pollos o disminución del tamaño del hígado en las aves adultas (Bunts y cols., 1986) y Dupiellet (1984) demostró mediante inoculación intranasal en pavos, que esta misma cepa era capaz de provocar sinusitis, rinitis, conjuntivitis y aerosaculitis a los 22 días post inoculación.

Por último hay que destacar que Osama y cols. (1996) describieron que las cepas de *M. imitans* (4229^T y B2/85) causan ciliostasis en pollos y en embriones de patos y una alta mortalidad en embriones de pollos, gansos y patos.

Mycoplasma lipofasciens.

M. lipofasciens fue descrito por primera vez por Bradbury y cols. (1983) en un estudio de prevalencia de micoplasmas en el tracto respiratorio de pollos de corral. Con posterioridad, se aisló este micoplasma en un pato sin sintomatología clínica, pero Bencina y cols. (1987b) observaron una elevada prevalencia (23,8 %) en pollos broilers.

En un estudio realizado con 424 huevos de aves rapaces, se identificó, mediante el cultivo y PCR, la presencia de esta bacteria denominada cepa *M. lipofasciens* (ML 64) en un huevo de azor común (*Accipiter gentilis*) (Lierz y cols., 2007a). En este mismo trabajo observaron que *M. lipofasciens* (ML 64) provocaba una elevada mortalidad a las dos primeras semanas de incubación en embriones de pollos libre de patógenos específicos, y esta cepa presentaba una alta patogenicidad en embriones de pavo, lo que causaba una alta mortalidad (88,9 %) en el último periodo de la incubación, así como enanismo, dedos retorcidos e infiltrados heterofílicos en el hígado, riñón, intestino y membrana corioalantoidea.

Lierz y cols. (2008b) demostraron la capacidad de reproducción de este micoplasma en humanos, al describir la presencia del *M. lipofaciens* (ML 64) en la nariz de un veterinario de una explotación avícola que padecía un cuadro clínico respiratorio con rinitis y dolor de garganta tras cuatro días de contacto con los animales.

Mycoplasma pullorum.

M. pullorum fue aislado por primera vez por Jordan (1985) como un micoplasma saprofita del tracto respiratorio de las aves y contaminante frecuente en cultivos (Glisson, 1993; Kleven & Levinshon, 1996). Sin embargo, Kempf y cols. (1997) hallaron dos nuevas cepas de *M. pullorum* descritas como posibles agentes patógenos. Más tarde, en Cuba, Lobo y cols. (2002) aislaron este micoplasma a partir de exudados traqueales de pollos con síntomas clínicos similares a los del síndrome respiratorio crónico de las aves

El único aislamiento de *M. pullorum* en aves silvestre fue obtenido por Poveda y cols. (1990a) en una paloma bravía (*Columba livia*) aparentemente normal.

Mycoplasma sphenisci.

Este micoplasma fue aislado por Frasca y cols. (2005) a partir de una muestra en la coana de un pingüino del cabo (*Spheniscus demersus*) de dos años y ocho meses de edad. Este animal formaba parte de una colonia de 40 pingüinos del cabo, 15 pingüinos de penacho amarillo (*Eudyptes crestatus*) y 14 pingüinos azules (*Eudyptula minor*) que convivían en el mismo acuario.

Este animal sufría una marcada halitosis y desde hacía 6 meses presentaba una descarga mucosa recurrente en ambas coanas, pero no se aisló ningún tipo de microorganismo patógeno. Sin embargo, al realizar técnicas de aglutinación, el suero de este animal fue positivo frente a los anticuerpos de *M. gallisepticum* y *M. synoviae*.

Mycoplasma sturni.

M. sturni fue descrito por primera vez como especie nueva en el año 1996 en Estados Unidos a partir del saco conjuntival de un estornino pinto (*Sturnus vulgaris*) (Forsyth y cols., 1996). Este animal presentaba graves episodios de conjuntivitis pero los propios autores dudaban del papel patógeno principal de este micoplasma.

Posteriormente se describió la presencia del *M. sturni* en otro estornino con conjuntivitis bilateral por Frasca y cols. (1997) y más tarde se aisló en un cuervo azul (*Cyanocitta cristata*) y en un sinsonte (*Mimus polyglottos*) por Ley y cols. (1998) que presentaba signos de sinusitis con conjuntivitis. En 2001 se aisló en un cuervo americano (*Corvus brachyrhynchos*) por Wellehan y cols. (2001) con conjuntivitis. En este mismo trabajo se describió la presencia de *M. sturni* en un zorzal pechirrojo (*Turdus migratorius*) y en un estornino pinto (*Sturni vulgaris*) que no presentaban sintomatología por Luttrell & Fischer (2007). Esta heterogeneidad en los aislamientos de *M. sturni* a partir de diferentes especies fue observada mediante análisis de ADN (RAPD) por Wellehan y cols. (2001).

Mycoplasma vulturii.

Este microorganismo (*M. vulturii* Gb-V33) solo se ha logrado replicar en fibroblastos de embriones de pollo a partir de muestras de pulmón y bazo de un buitre bengalí (*Gyps bengalensis*) de Pakistán, con claros síntomas de intoxicación por diclofenaco, pero en el que también se observó una inflamación difusa en tráquea y bronquios (Oaks y cols., 2004).

I.3.2.3.3. Micoplasmas desconocidos o sin identificar.

El estudio y comparación de las secuencias del gen ARNr 16S ha tenido una enorme repercusión en la taxonomía bacteriana, hecho que ha contribuido a la descripción de nuevos micoplasmas cuya identificación, mediante otras técnicas, resultaría muy complicada y laboriosa.

En el año 2002, se detectó la presencia de un micoplasma desconocido en todos los órganos de un águila imperial ibérica (*Aquila adalberti*) que sufría una grave anemia. Posteriormente se identificó esta misma bacteria, denominada “*M. aquilae*”, en el 67% de las águilas de este proyecto de conservación por Höfle y cols. (2002). Kübber-Heiss y cols. (2010) identificaron este mismo micoplasma en un absceso hepático en un macho de ratonero común (*Buteo buteo*) que había ingresado muerto en el Centro de Recuperación de Fauna Silvestre de Siena (Italia) y que mostraba varios abscesos infraorbitales con contenido fibrino-purulento y una fuerte sinusitis.

Botes y cols. (2005) identifican, mediante el secuenciado del gen ARNr 16S, un nuevo micoplasma en avestruces (*Struthio camelus*) en Sudáfrica, cuya presencia se asoció a las infecciones que sufrían estas aves en las vías aéreas superiores, lo que ocasiona considerables pérdidas económicas a la industria de ese país.

En un estudio realizado por Loria y cols. (2008) en buitres leonados (*Gyps fulvus*) dentro del proyecto de reintroducción de esta especie en Sicilia, se detectó la presencia de tres micoplasmas desconocidos. El análisis del gen ARNr 16S mostró que eran muy parecidos a *M. glycyphilum*, *M. falconis* y *M. gateae*, respectivamente. Posteriormente se describieron dos nuevos micoplasmas más en esta misma especie de buitre en

Sardinia (Italia) que se encontraban dentro del cluster *synoviae* y *hominis* por Lecis y cols. (2010a).

En ese mismo año, la secuenciación del gen ARNr 16S de seis aislamientos no identificados en el Proyecto de Conservación del Cernícalo primilla (*Falco naumanni*) en el sur de España, mostró que cinco de los aislamientos eran similares entre sí y con un micoplasma aislado previamente en un halcón proveniente de Alemania (Lierz y cols., 2008d), cuya secuencia del gen ARNr 16S era similar en un 97% al *Mycoplasma verecundum*.

I.4. MATERIAL Y MÉTODOS

Alejandro Suárez Pérez

I.4.1. Aislamiento de micoplasmas aviáres.

I.4.1.1. Especies aviáres muestreadas.

Las aves muestreadas en este estudio procedieron en su mayoría de centros de recuperación de fauna silvestre. Las causas de ingreso más frecuentes fueron las colisiones con vehículos o con torres eléctricas, la caída de pollos en primavera, intoxicaciones por sustancias tóxicas, enredos en trampas, enfermedades causadas por patógenos bacterianos, fúngicos, parasitarios y/o víricos, traumatismos desconocidos o disparos (**Tabla 1 y 2**).

I.4.1.2. Toma de muestras y aislamiento de micoplasmas.

Entre los años 2007 y 2010 se analizaron un total de 552 muestras en 75 especies de aves silvestres.

El 86,80 % (480 aves) se obtuvo durante la primera exploración clínica de estos animales en el momento de su ingreso en el Centro de Recuperación de Fauna Silvestre "Tafira" en Gran Canaria.

El otro 13,20 % de las muestras fue tomado en estancias en el Centro de Recuperación de Fauna Silvestre de Ciudad Real "El Chaparrillo", Centro de Recuperación de Valencia "El Saler" y en el Centro de Estudios de Rapaces Ibéricas en Toledo (CERI). En este periodo también se tomaron muestras en los proyectos de conservación y/o cría en cautividad de especies amenazadas como el Águila imperial ibérica (*Aquila adalberti*) y el Águila azor perdicera (*Hieraaetus fasciatus*) en Castilla La

Mancha, el Pinzón azul de Gran Canaria (*Fringilla teydea polatzeki*), la Paloma rabiche (*Columba junoniae*) y la Paloma turqué (*Columba bollii*) en Gran Canaria, el Urogallo (*Tetrao urogallus*) en Cantabria, la Focha cornuda (*Fulica cristata*) en Valencia, el Alcaudón chico (*Lanius minor*) en Cataluña, el Quebrantahuesos (*Gypaetus barbatus*) en Aragón y en el Proyecto de Cría en Cautividad del Guacamayo de spix (*Cyanopsitta spixii*) gestionado por Loro Parque en Tenerife.

Tabla 1.
Causas de admisión de las aves del estudio.

Número	%	Causas de admisión
182	32,9	Traumatismos desconocidos (fracturas, daño en el patagio o luxaciones).
76	13,7	Inanición y/o debilidad.
55	9,9	Caída de pollos del nido.
51	9,2	Proyecto de conservación/cría en cautividad.
38	6,8	Intoxicaciones por sustancias tóxicas.
37	6,7	Sin lesiones aparentes.
34	6,1	Enfermedad bacteriana, parasitaria o fúngica.
17	3	Electrocución.
16	2,9	Colisión (vehículos, cables eléctricos)
13	2,3	Expolio en el nido.
12	2,1	Disparo.
11	1,9	Trampas de pegamento o enredados con nylon.
7	1,2	Ingestión de anzuelos.
4	0,7.	Ingestión de petróleo.
552		

Las muestras se obtuvieron en la mayoría de las ocasiones con un hisopo estéril en tráquea (T) o en coanas (CO) e inoculadas en 2 ml de medio de cultivo líquido **PH** (Kirchhoff & Rosengarten, 1984) (85,5 %) y **SP4-II** (Ramírez y cols., 1997) (14,5%). En otras ocasiones, se tomaron muestras en la cloaca, pero era tan bajo el número de aislamientos, que se optó solamente por la toma de muestras en las vías respiratorias altas.

Estos medios de cultivo son específicos para el aislamiento de estas bacterias, ya que los micoplasmas poseen un genoma pequeño y una capacidad biosintética limitada, por lo que requieren una amplia variedad de moléculas precursoras para la síntesis de macromoléculas. La composición y el modo de preparación de estos medios de cultivo están definidos en el **Anexo: Medios y reactivos**.

Los tubos de medio líquido con el hisopo se transportaron rápidamente al laboratorio donde se incubaron a 37°C y fueron filtrados a las 24 horas a través de filtros (PALL Acrodisc® Syringe Filters) con un tamaño de poro de 0,45 micrómetros, para de esta forma obtener cultivos puros de micoplasmas sin la presencia de otro tipo de bacterias.

El filtrado con medio nuevo fue incubado a 37°C entre 2 y 15 días y posteriormente se sembraron 0,2 ml de cada cultivo en medio sólido.

La incubación de las placas se llevó a cabo en cámara húmeda, a 37°C y en aerobiosis durante al menos 15 días antes de considerarlas negativas. En el caso de observar colonias típicas de “huevo frito” en el medio sólido, se procedió a realizar una triple clonación y almacenamiento de las cepas en cultivo puro.

Tabla 2.
Aves muestreadas y su procedencia.

Nº	Nombre científico	Nombre común	Procedencia
2	<i>Accipiter gentilis</i>	Azor	CR Ciudad Real
3	<i>Accipiter nissus</i>	Gavilán	CR Tafira
1	<i>Alcedo atthis</i>	Martín pescador	"
1	<i>Anas crecca</i>	Cerceta común	"
1	<i>Anemari interpres</i>	Vuelvepiedras	"
5	<i>Aquila adalberti</i>	Águila imperial ibérica	Proyecto de cría. Toledo
4	<i>Aquila chrysaetos</i>	Águila real	3 CR Toledo / 1 CR Ciudad Real
15	<i>Ardea cinerea</i>	Garza real	CR Tafira
36	<i>Asio otus</i>	Búho chico	"
10	<i>Athene noctua</i>	Mochuelo europeo	3 CR Toledo/7 CR Valencia
1	<i>Botaurus stellaris</i>	Avetoro común	CR Tafira
1	<i>Bubo capensis</i>	Búho del cabo	"
3	<i>Bulweria bulwerii</i>	Petrel de bulwer	"
41	<i>Burhinus oedicnemus</i>	Alcaraván común	"
28	<i>Buteo buteo</i>	Ratonero común	27 CR Tafira /1 CR Valencia
1	<i>Calidris alpina</i>	Correlimos común	CR Tafira
42	<i>Calonectris diomedea</i>	Pardela cenicienta	"
2	<i>Chlamydotis undulata fuertaventurae</i>	Hubara canaria	"
1	<i>Charadrius alexandrinus</i>	Chorlitejo patinegro	"
6	<i>Ciconia ciconia</i>	Cigüeña blanca	5 CR Ciudad Real/1CR Toledo
1	<i>Ciconia nigra</i>	Cigüeña negra	CR Ciudad Real
5	<i>Circaetus gallicus</i>	Águila culebrera	3 CR Ciudad Real / 2 CR Toledo
2	<i>Circus aeruginosus</i>	Aguilucho lagunero	CR Toledo
2	<i>Columba bollii</i>	Paloma turqué	CR Tafira
1	<i>Columba livia</i>	Paloma bravía	"
13	<i>Columba junoniae</i>	Paloma rabiche	Proyecto de cría. Gran Canaria
5	<i>Corvus corax</i>	Cuervo	CR Tafira
1	<i>Cuculus canorus</i>	Cuco común	"
2	<i>Cyanopsitta spixii</i>	Guacamayo spix	Proyecto de cría. Tenerife
1	<i>Dendrocopos major</i>	Pico picapinos	CR Tafira
3	<i>Egretta garcetta</i>	Garceta común	"
2	<i>Falco naumanni</i>	Cernícalo primilla	CR Ciudad Real
8	<i>Falco peregrinoides</i>	Halcón de tagarote	CR Tafira
58	<i>Falco tinnunculus</i>	Cernícalo vulgar	53 CR Tafira / 5 CR Toledo
1	<i>Fratercula arctica</i>	Frailecillo común	CR Tafira
3	<i>Fringilla teydea polatzequi</i>	Pinzón azul de Gran Canaria	Proyecto de cría. Gran Canaria

1	<i>Fringilla teydea teydea</i>	Pinzón azul de Tenerife	Proyecto de cría. Gran Canaria
6	<i>Fulica cristata</i>	Focha cornuda	Proyecto de cría. Valencia
1	<i>Fulmar glaciaris</i>	Fulmar	CR Tafira
3	<i>Gallinula chloropus</i>	Gallineta común	"
2	<i>Gyps fulvus</i>	Buitre leonado	CR Ciudad Real
1	<i>Gypaetus barbatus</i>	Quebrantahuesos	Proyecto recuperación Aragón
14	<i>Hieraetus fasciatus</i>	Águila azor-perdicera	Proyecto de cría. Toledo
3	<i>Hieraetus pennatus</i>	Águila calzada	2 CR Toledo / 1 CR Ciudad Real
1	<i>Ixobrychus minutus</i>	Avetorillo común	CR Tafira
12	<i>Lanius minor</i>	Alcaudón chico	Proyecto de cría. Barcelona
53	<i>Larus michahellis</i>	Gaviota patiamarilla	CR Tafira
3	<i>Larus ridibundus</i>	Gaviota reidora	"
1	<i>Merops apiaster</i>	Abejaruco común	"
2	<i>Milvus migrans</i>	Milano negro	"
4	<i>Morus bassanus</i>	Alcatraz común	"
1	<i>Myopssita monachus</i>	Cotorra de pecho gris	"
1	<i>Neophron monachus</i>	Alimoche encapuchado	"
13	<i>Neophron percnopterus majorensis</i>	Alimoche canario "Guirre"	Proyecto de recuperación. Fuerteventura
5	<i>Numenius phaeopus</i>	Zarapito trinador	"
2	<i>Nycticorax nycticorax</i>	Martinete común	"
1	<i>Oriolus oriolus</i>	Oropéndola	"
2	<i>Otus scops</i>	Autillo europeo	1 CR Tafira / 1 CR Ciudad Real
2	<i>Parabuteo unicintus superior</i>	Halcón de harries	CR Tafira
1	<i>Pavo cristatus</i>	Pavo real	CR Tafira
1	<i>Porphyryla alleni</i>	Calamón de allen	"
1	<i>Psittacula krameri</i>	Cotorra de kramer	"
1	<i>Rissa tridactyla</i>	Gaviota tridáctila	"
1	<i>Scolopax rusticola</i>	Chocha perdíz	"
1	<i>Serinus canaria</i>	Canario	"
1	<i>Stercorarius parasiticus</i>	Págalo parásito	"
2	<i>Sterna hirundo</i>	Charrán común	"
4	<i>Sterna sandvicensis</i>	Charrán patinegro	"
8	<i>Streptopelia decaocto</i>	Tórtola de collar	"
3	<i>Sturnus vulgaris</i>	Estornino pinto	"
16	<i>Turdus merula</i>	Mirlo común	"
1	<i>Turdus philomelos</i>	Zorzal común	"
13	<i>Tetrao urogallus</i>	Urogallo	Proyecto recuperación. Cantabria
14	<i>Tyto alba</i>	Lechuza común	CR Tafira
10	<i>Upupa epops</i>	Abubilla	"

I.4.1.3. Triple clonación.

De cada cultivo fresco se realizaron diluciones sucesivas y se sembraron en medio sólido con la finalidad de conseguir colonias bien separadas. Con la ayuda de una punta de pipeta estéril se tomaron colonias bien crecidas en el medio sólido y se cultivaron en medio líquido, repitiéndose esta acción tres veces según las recomendaciones de Tully (1983).

I.4.1.4. Almacenamiento de las cepas (Liofilización).

Antes de poder liofilizar los aislamientos, se cultivaron en medio líquido hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento de cada cepa.

Siguiendo las indicaciones de Leach (1983), y para proteger los microorganismos durante el proceso de liofilización, se añadió el mismo volumen de solución protectora, que se compone de suero de caballo inactivado e inositol disuelto en agua destilada (**Anexo: Medios y reactivos**).

Esta mezcla se dispensó en viales especiales para la liofilización y se congeló a -80°C , durante un tiempo mínimo de 24 horas y posteriormente se procedió a la liofilización en un liofilizador Telstar de la siguiente forma: (a) se conectó el liofilizador y se esperó a que la temperatura bajara a -60°C , (b) se introdujeron los viales de liofilización y se pulsó el interruptor de vacío (este proceso se mantuvo durante 24 horas), (c) se procedió, antes de suprimir el vacío, a cerrar los viales con un sistema de prensa que posee el aparato, (d) se eliminó el vacío y se extrajeron los viales, ya

liofilizados y cerrados, (e) se procedió, por último, al sellado de todos los viales. De esta manera se liofilizaron unos 1.100 viales.

I.4.2. Identificación de micoplasmas aviares.

I.4.2.1. Pruebas orientativas.

I.4.2.1.1. Test de sensibilidad a la digitonina.

Para la realización de esta prueba se utilizó un cultivo líquido fresco con una concentración aproximada de 10^5 ufc/ml, del que se transfirieron 200 μ l a una placa de medio sólido SP4-II o PH al 20 % de suero de caballo, cantidad recomendada por Tully (1983) para la realización de esta prueba. El exceso de inóculo se retiró con la ayuda de una pipeta y, cuando fue absorbido por el medio, se depositaron sobre la superficie del medio sólido los discos impregnados con digitonina. A continuación se incubaron las placas en atmósfera húmeda, a 37°C durante un periodo comprendido entre 24 y 96 horas.

Para la elaboración de los discos de digitonina se preparó una solución alcohólica de digitonina al 1,5 % (p/v), la cual se disolvió con ayuda de calor y, una vez disuelta, se impregnaron 20 μ l de dicha solución en discos de papel de filtro estériles de 6 mm de diámetro. Los discos se introdujeron en una estufa a 37°C y, una vez secos, se conservaron a 4°C.

I.4.2.1.2. Pruebas bioquímicas y enzimáticas.

Los organismos tuvieron que ser sometidos a crecimiento rápido (1-2 días) en los medios de PH o SP4 II líquido con un 20 % de suero de caballo. Este paso es muy importante ya que el resultado de las pruebas bioquímicas de las cepas investigadas depende de su buen crecimiento en los medios de cultivo.

Para el estudio de los perfiles bioquímicos se siguieron los métodos desarrollados por Poveda (1998). La composición y el modo de preparación de estos medios están definidos en el **Anexo: Medios y reactivos**.

Fermentación de la glucosa.

Se inocularon tubos de medio de glucosa con 200 µl de cultivo fresco y se les añadieron 0,5 ml de la parafina líquida estéril para conseguir un ambiente anaerobio. Los tubos se incubaron a 37°C, al igual que un tubo sin inóculo que actuó como control negativo. Esta prueba se consideró positiva cuando se produjo un descenso del pH del medio de al menos media unidad. El color del medio cambiaría hacia amarillo. Si el color del medio inoculado permaneció inalterado o la disminución fue menor del 0,5 del pH, al pasar 15 días, esta prueba se consideró negativa.

Fermentación de la manosa.

Los tubos con el medio de manosa fueron inoculados con 200 µl de cultivo fresco. Se dejó un tubo sin inocular para utilizarse como control negativo. Se les añadió la parafina líquida estéril (0,5 ml) y los tubos se incubaron a 37°C. Los resultados de esta

prueba se rigieron por las mismas normas que la prueba de la fermentación de la glucosa.

Hidrólisis de la urea.

El medio de urea, distribuido en tubos estériles de plástico, se inoculó con 200 μ l de cultivo fresco a excepción del tubo que se empleó como control negativo. Se crearon condiciones de anaerobiosis añadiendo 0,5 ml de parafina líquida estéril y se incubó a 37°C. Si la cepa investigada presentaba actividad ureásica, el pH aumentaría al menos 0,5, por lo que el color del indicador de pH (rojo fenol) se inclinaría hacia rojo-violeta. Esta prueba no se consideraba negativa hasta pasadas dos semanas. Con esta prueba se diferencian los ureaplasmas, los únicos que presentan dicha actividad, del resto de los *Mollicutes*.

Reducción del trifeníl-tetrazolium.

Para demostrar la capacidad de reducción del tetrazolium de las cepas objeto de estudio, se inocularon tubos con el medio de trifeníl-tetrazolium. Se crearon condiciones de anaerobiosis añadiendo 0,5 ml de parafina líquida estéril. Como control negativo se utilizó medio sin inocular. Se incubó a 37°C de temperatura, de 1 a 15 días. La positividad de la reacción se pudo observar por la presencia de un precipitado rojo en el fondo del tubo.

Hidrólisis de la arginina.

Con esta prueba se pretendía detectar la actividad de la arginina dehidrolasa de los micoplasmas. Se inoculó el medio con 200 μ l de cultivo fresco y se selló con 0,5 ml de parafina líquida estéril. La estufa donde se incubaron los tubos estaba a una temperatura de 37°C. También se incubó medio sin inocular para utilizarse como control negativo. Las lecturas se realizaron a diario durante 2 semanas. Si el medio alcalinizaba, la prueba se consideraba positiva, mientras que si el indicador de pH no cambiaba a rojo violáceo, la prueba se daba como negativa.

Producción de película y cristales.

Mediante esta prueba se pone de manifiesto la presencia o ausencia de actividad lipolítica. Con la ayuda de un microscopio óptico y con el objetivo de 4 aumentos, en el caso de ser la prueba positiva, se observó la formación de cristales (precipitados de Ca y Mg) alrededor de las colonias. En el caso de observar esta película y cristales, al inundar la placa con agua destilada, se debería desprender una fina capa de lípidos que quedaría flotando. Ambos efectos siempre aparecen juntos, ya que son el resultado de la acción de una lipasa.

I.4.2.1.3. Electroforesis de proteínas (SDS PAGE).

La electroforesis consiste en un conjunto importante de métodos para la separación de moléculas que en nuestro caso fue utilizada para la separación de proteínas. La forma más común de separar mezclas complejas de proteínas es por electroforesis en un gel 1-D monodimensional de poliacrilamida en dodecil sulfato sódico (SDS), mediante la cual las proteínas se separan según su masa molecular al someterlas a un campo eléctrico.

En esta Tesis Doctoral se realizó la electroforesis de proteínas en geles formados por un polímero entrecruzado de poliacrilamida. Este gel actuó como una criba molecular, retrasando el desplazamiento de las proteínas en una forma proporcional a su masa molecular.

Previamente a la electroforesis, las muestras fueron tratadas con SDS, que desnaturizó las proteínas, eliminando la estructura proteica secundaria y terciaria no unida por puentes de disulfuro. Posteriormente, por medio del uso del 2-mercaptoetanol se eliminaron los puentes disulfuro. Las proteínas se cargaron en geles verticales de poliacrilamida, y por medio de electroforesis convencional se separaron en función de su peso molecular.

Preparación de los geles de acrilamida para el SDS PAGE:

Los geles se componían de dos partes: un gel de concentración “*stacking gel*” para igualar todas las muestras y un gel de resolución “*resolving gel*” en que se visualizan las bandas polipeptídicas de cada micoplasma. Las cantidades de reactivos utilizadas están descritas en el **Anexo**: Medios y reactivos.

Preparación de las muestras.

A cada muestra se añadió 15,2 μ l de tampón de carga con SDS y 5 μ l de PBS, se mezclaron bien en el vortex y posteriormente permanecieron en ebullición a 100°C durante 10 minutos. Los geles fueron sometidos a una corriente constante de 6.5 mA durante 18 horas en una unidad de electroforesis vertical (Protean II xi, bio-Rad), siguiendo el método de Laemmli (1970) y la tinción de los geles se realizó con la tinción Imperial™ Protein Stain.

El método de extracción de las proteínas fue el siguiente: (a) se sembraron las cepas en 60 ml de medio líquido de cultivo (el tiempo de sembrado varió entre las cepas), (b) se centrifugó el cultivo a 8000 $\times g$ durante media hora a 4°C y se retiró el sobrenadante, (c) se añadió 1 ml de PBS, se pasó a un eppendorf y se mezcló en el vortex para volver a centrifugar a 14000 $\times g$ durante 10 minutos, (d) se retiró el sobrenadante y se repitió el procedimiento dos veces más. Finalmente se mezcló el sedimento en 200 μ l de PBS.

Para la cuantificación de las proteínas obtenidas se utilizó la Técnica de Lowry según las indicaciones de Bozimosk y cols. (1983). Esta técnica se basa en la capacidad de los aminoácidos para dar reacciones características con ciertos reactivos de acuerdo con la naturaleza de sus cadenas laterales.

Para la elaboración de esta técnica, se trató la muestra de proteína con el reactivo de *Folin Ciocalteu* modificado. Esta reacción produce una coloración azul debido principalmente a la presencia de residuos de tirosina y triptófano en las proteínas.

Se midió la absorbancia a 650 nm con el espectrofotómetro SmartSpec™ 3000 de Bio-Rad y se comparó con las medidas obtenidas de soluciones de proteínas de concentración conocida (en nuestro caso utilizamos la albúmina), tratadas de forma idéntica.

I.4.2.1.4. Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización (DGGE).

En este estudio se analizaron, a través de esta técnica, las cepas de las especies aviarias cuyos aislamientos eran muy abundantes y de esta manera se clasificaron en grupos según su movimiento de banda en el gel DGGE.

El primer paso fue la extracción de ADN de las muestras que se querían estudiar. Para dicha extracción se transfirieron 100 µl de cada cepa a un nuevo vial eppendorf y se añadieron 100 µl de solución desnaturalizante. Se mezcló en un vortex y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, pasados los cuales se añadieron 40 µl de sílica y 800 µl de solución de lisis. Se colocó en un rotor durante 10 minutos en agitación constante. Posteriormente, se agitó en el vortex durante 5 segundos y se centrifugó 15 segundos más a 14.000 *g*. Se desechó el sobrenadante y se añadieron 800 µl de solución de lavado. Se centrifugó y se desechó el sobrenadante. Se repitió el lavado otra vez con solución de lavado, dos con etanol al 70 % y una con acetona. Se colocó el vial eppendorf con el sedimento durante 10 minutos a 56°C con la tapa abierta, para eliminar cualquier vestigio de acetona. Se añadieron 100 µl de TE y se colocó diez minutos más a 56°C (esta vez con la tapa cerrada). Se centrifugó durante 2 minutos a 14.000 *g* y se transfirió el sobrenadante con el ADN a un nuevo vial eppendorf.

Para la reacción de PCR se mezclaron 16,75 µl de agua ultrapura estéril, 1 µl de solución de dNTPs a 10 mM, 1,5 µl de solución de Mg Cl a 50 mM, 2,5 µl de buffer, 0,25 µl de Taq polimerasa 5U/ µl, 1 µl de cada primer en una concentración de 25 mM y 5 µl de ADN.

La PCR se realizó en el termociclador Mastercycler Gradient de Eppendorf y las condiciones para la amplificación fueron realizadas según las especificaciones de McAuliffe y cols. (2003):

Un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 95°C de un minuto, 55°C de 45 segundos y a 72°C por un minuto. Para finalizar la PCR se realizó un último ciclo a 72°C durante 10 minutos para estabilizar las cadenas de ADN amplificadas y las muestras fueron conservadas a 4°C hasta su análisis.

Como control positivo se utilizó 5 µl de ADN de la cepa de referencia *M. falconis* H/T1 y como control negativo 5 µl de agua bidestilada estéril.

La amplificación de la región V3 del gen ARNr 16S de las cepas fue realizada con el primer universal para bacterias **GC- 34I**: (5´CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGC CCA CGG GGC GCC TAC GGG AGG CAG CAG 3´) y el primer específico de *Mollicutes* **R543**: (5´ACC TAT GTA TTA CCG CG 3).

La confirmación de los resultados de la PCR se observó en un gel de agarosa al 2% al que se le añadió una gota de solución de Bromuro de Etidio. Se utilizó el tampón TAE como constituyente del gel y como tampón para correr la electroforesis. Esta se realizó a un voltaje constante de 80 voltios durante 45 minutos.

Las muestras positivas en la amplificación de PCR fueron tratadas según las especificaciones de McAuliffe y cols. (2003):

En primer lugar, se elaboraron las diferentes soluciones con sustancias desnaturizantes del gel DGGE (ver **Anexo**: Medios y reactivos).

En segundo, lugar se limpiaron los cristales con etanol al 70 % y se aclararon con agua destilada antes de montarlos. Se vertieron 17 ml de la solución “High” y 17 ml de la solución “Low” en dos matraces diferentes y se añadieron 81 µl de APS al 10% a cada solución. Se agregaron 4,5 µl de TEMED a cada solución y se mezclaron suavemente. Se cargaron dos jeringas con las dos soluciones y se depositaron en los cristales.

Posteriormente se rellenó el tanque de electroforesis con 7 litros de buffer 1 x TAE para iniciar el programa del DCode™ y calentar el buffer a 60°C una hora antes de la colocación de los cristales con el gel.

Cada una de las muestras fueron mezcladas con 10 µl de “Loading buffer” y dicha solución (10 µl de muestra más 10 µl de loading buffer) se introdujo en los pocillos del gel DGGE.

Los geles fueron sometidos a una corriente constante de 60 voltios durante 16 horas en el DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad).

La tinción y visualización del gel se realizó con Sybr Gold (10 µl de Sybr Gold en 100 ml de tampón TAE 1 x Buffer) durante 30 minutos en condiciones de oscuridad.

I.4.2.2. Pruebas definitivas.

I.4.2.2.1. Prueba de inhibición de crecimiento.

En esta Tesis Doctoral se optó por realizar la prueba de inhibición del crecimiento según las indicaciones de Poveda & Nicholas (1998):

Por un lado, se sembraron en placas con medio sólido, 200 μ l de cada cultivo a una concentración de 10^4 - 10^6 ufc/ml y por otro lado se impregnaron discos estériles de papel de filtro de 6 milímetros de diámetro con 20 μ l de cada uno de los antisueros monoespecíficos, elaborados anteriormente por conejos frente a las siguientes cepas de referencia: *M. anatis* 1340, *M. columbinasale* 694, *M. columbinum* MMP-1, *M. columborale* MMP-4, *M. gallinaceum* DDT, *M. gallinarum* PG16, *M. gallisepticum* PG31, *M. gallopavonis* WR1, *M. iners* PG30, *M. iowae* 695, *M. meleagridis* 17529, *M. pullorum* CKK, *M. synoviae* WVU 1853, *M. falconis* H/T1, *M. buteonis* Bb/T1, *M. gypis* BT1/T1 y *M. spp.* 1449.

Una vez absorbido el inóculo por el medio, se procedió a depositar en la placa, con ayuda de unas pinzas flameadas, los discos impregnados con los antisueros. Con el fin de facilitar la difusión del antisuero antes del crecimiento de los micoplasmas, se mantuvieron las placas en cámara húmeda, a 25°C durante 24 horas. Pasado este tiempo se incubaron las placas a 37°C en cámara húmeda durante un periodo comprendido entre 24 y 96 horas.

La presencia de un halo de inhibición alrededor de los discos, con un mínimo de 2 milímetros, fue examinada al microscopio óptico a 40 aumentos. Se consideraron

lecturas positivas tanto las que presentaban un halo sin ninguna colonia, como las que mostraban una clarificación del crecimiento bastante manifiesta, según las especificaciones de Clyde (1983).

I.4.2.2.2. Análisis molecular del gen ARNr 16S y de la región intergénica (ISR).

El método molecular de identificación de los micoplasmas de este estudio mediante la secuenciación del gen ARNr 16S y de la región intergénica (ISR) incluyó tres etapas:

1. Amplificación del gen a partir de las muestra de ADN.
2. Secuenciación del producto amplificado.
3. Análisis de las secuencias.

Amplificación del gen a partir de las muestras de ADN:

La amplificación del gen ARNr 16S y de la región intergénica (ISR) se realizó en el termociclador Mastercycler Gradient de Eppendorf, gracias a la reacción en cadena de la polimerasa PCR. Como sustrato se utilizó el ADN purificado a partir de los cultivos de las cepas representativas elegidas tras los resultados de las pruebas orientativas y tras su análisis con la técnica de DGGE (**Tabla 4**).

Tabla 4.
Cepas representativas analizadas.

<i>Accipiter nissus</i> : T533T, T533C y T249T.	<i>Aquila adalberti</i> : T485T, T479T, T475T.
<i>Aquila chrysaetos</i> : T491T, T517T.	<i>Ardea cinerea</i> : T136T.
<i>Asio otus</i> : T199T, T12T.	<i>Athene noctua</i> : T500T, T496T.
<i>Burhinus oedicnemus</i> : T4T, T4C, T245T, T304T, T138T.	<i>Buteo buteo</i> : T58T, T106T, T233T ₁ , T6T, T233T ₂ , T326T, T128T.
<i>Calonectris diomedea</i> : T230T.	<i>Ciconia ciconia</i> : T452T, T453 CO, T454T.
<i>Ciconia nigra</i> : T495CO	<i>Circaetus gallicus</i> : T457CO.
<i>Circus aeruginosus</i> : T469T.	<i>Falco naumanni</i> : T455T, T458T.
<i>Falco pelegrinoides</i> : T187T, T286T.	<i>Falco tinnunculus</i> : T90T, T91T, T109T, T88C, T88T, T200T, T95T, T72T, T159T, T101T.
<i>Fratercula ártica</i> : T398T.	<i>Fulmar glaciaris</i> : T192T.
<i>Gypaetus barbatus</i> : T549T.	<i>Gyps fulvus</i> : T494T, T513CO.
<i>Hieraaetus fasciatus</i> : T550T.	<i>Larus michahellis</i> : T158T, T98T, T391T, T50T, T350T, T164T, T346T, T389T, T264T.
<i>Larus ridibundus</i> : T270T, T265T.	<i>Milvus migrans</i> : T196T.
<i>Morus bassanus</i> : T125T.	<i>Neoprhon monachus</i> : T193T.
<i>Nycticorax nycticorax</i> : T311T.	<i>Otus scops</i> : T459T.
<i>Rissa tridactyla</i> : T396T.	<i>Tetrao urogallus</i> : T541T.
<i>Tyto alba</i> : T481T, T476, T237T.	<i>Upupa epops</i> : T41T, T65T, T93T, T48T.

La extracción de ADN y la reacción de PCR se realizaron según las especificaciones anteriormente citadas modificando los juegos de primer. (Tabla 5)

Tabla 5.		REFERENCIAS
16 S - start pos: 5'GAG AGT TTG ATC CTG CGT CAG G- 3'	16 S - 550 neg: 5' CCC AAT AAA TCC GGA TAA CGC TTG C-3'	(Naylor, comunicación personal)
16 S - 510 pos: 5' CTG ACG CGT AAC TAT GTC CCA GCA G- 3'	16 S - 1050 neg: 5' GCT GAC GAC AAC CAT GCA GC- 3'	"
16 S - 980 pos: 5'CGA AGA ACC TTA CCC ACT CTT GAC ATC- 3'	16 S - end neg: 5'GGT AAT CCA TCC CCA CGT TCT CG-3'	"
16S + C: 5' CGT TCT CGG GTC TTG TAC AC-3'	23 S – B: (CGC AGG TTT GCA CGT CCT TCA TCG-3').	(Harasawa y cols., 2004)

Las condiciones usadas para la amplificación del gen ARNr 16 S fueron descritas por Naylor (comunicación personal): Un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos y un ciclo de elongación a 72°C de 2 minutos, seguido de 30 ciclos con los mismos parámetros, excepto la extensión de 2 segundos por ciclo en el paso de elongación. Como control positivo se utilizó 5 µl de ADN de la cepa de referencia *M. falconis* H/T1 y como control negativo 5 µl de agua bidestilada estéril.

Las condiciones usadas para la amplificación de la región intergénica ISR fueron descritas por Harasawa y cols. (2004): Cinco ciclos de desnaturalización a 94°C durante 15 segundos, 30 segundos a 60°C y un ciclo de elongación a 72°C de dos minutos, seguido de 30 ciclos con los mismos parámetros, excepto la extensión de 2 segundos por ciclo en el paso de elongación. Como control positivo se utilizó 1 µl de ADN de la cepa de referencia *M. falconis* H/T1 y como control negativo 1 µl de agua bidestilada estéril.

Para la confirmación de los resultados de la PCR y para asegurar la presencia de un único fragmento del tamaño adecuado, se observó el producto de amplificación en un gel de agarosa al 1 % al cual se añadió una gota de solución de bromuro de etidio. Se utilizó el tampón TAE como constituyente del gel y como tampón para correr la electroforesis, que se realizó a un voltaje constante de 80 voltios durante 45 minutos.

Secuenciación del producto amplificado:

La secuenciación fue realizada en el Servicio de Genética Forense de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria utilizando el secuenciador *3130 xl Genetic Analyzer* y procesando las muestras con el software *Run 3130xl Data Collection V3.0*.

Análisis de las secuencias:

La última etapa fue la comparación de la secuencia del gen ARNr 16S y de la región intergénica entre los genes 16S y 23S con las depositadas en el *Gene-Bank Database* con el programa MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 (Tamura y cols., 2007). Esto permitió la comparación de las secuencias *on line* y la construcción de árboles filogenéticos que reflejaron, de forma esquemática, el grado de parentesco genético entre los micoplasmas de este estudio.

I.5. RESULTADOS

Alejandro Suárez Pérez

I.5.1. Aislamientos de micoplasmas.

Durante el estudio se aislaron 174 cepas compatibles con bacterias del género *Mycoplasma* a partir de 552 muestras obtenidas de aves silvestres ingresadas en los centros de recuperación, así como de aves pertenecientes a proyectos de cría en cautividad (**Tabla 6**). Esto supuso un 32 % de muestras positivas, sobre todo en aves rapaces (**Gráfica 1**), menos en el caso de las rapaces de hábitos nocturnos de las que se obtuvieron pocos aislamientos con respecto al total de muestras analizadas (**Gráfica 2**).

Por otro lado, se detectó un bajo porcentaje de aislamientos en aves marinas y más concretamente en la especie pardela cenicienta (*Calonectris diomedea*) con 42 muestras recogidas, de las que se aisló un único micoplasma. Todo lo contrario sucedió en la especie gaviota patiamarilla (*Larus michahellis*), ya que se obtuvieron 31 aislamientos en 53 aves muestreadas (**Gráfica 3**).

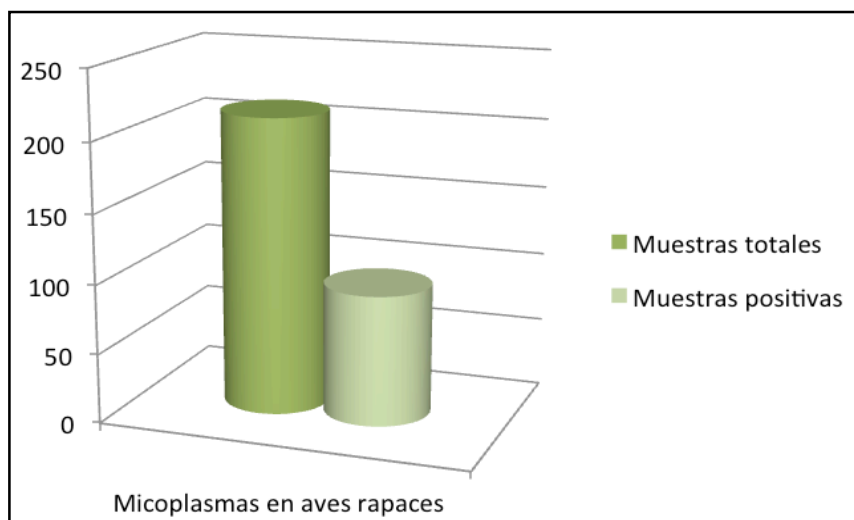
Tabla 6. Relación de muestras totales (MT) y aislamientos (A) en el estudio.			
MT	A	Nombre científico	Nombre común
2	0	<i>Accipiter gentilis</i>	Azor
3	3	<i>Accipiter nissus</i>	Gavilán
1	0	<i>Alcedo atthis</i>	Martín pescador
1	0	<i>Anas crecca</i>	Cerceta común
1	0	<i>Anemari interpres</i>	Vuelvepedras
5	4	<i>Aquila adalberti</i>	Águila imperial ibérica
4	2	<i>Aquila chrysaetos</i>	Águila real
15	1	<i>Ardea cinerea</i>	Garza real
36	2	<i>Asio otus</i>	Búho chico
10	3	<i>Athene noctua</i>	Mochuelo europeo
1	0	<i>Botaurus stellaris</i>	Avetoro común
1	0	<i>Bubo capensis</i>	Búho del cabo
3	0	<i>Bulweria bulwerii</i>	Petrel de bulwer
41	17	<i>Burhinus oedicnmus</i>	Alcaraván común
28	12	<i>Buteo buteo</i>	Busardo ratonero

1	0	<i>Calidris alpina</i>	Correlimos común
42	1	<i>Calonectris diomedea</i>	Pardela cenicienta
2	0	<i>Chlamydotis undulata fuertaventurae</i>	Hubara canaria
1	0	<i>Charadrius alexandrinus</i>	Chorlito patinegro
6	6	<i>Ciconia ciconia</i>	Cigüeña blanca
1	1	<i>Ciconia nigra</i>	Cigüeña negra
5	2	<i>Circaetus gallicus</i>	Águila culebrera
2	1	<i>Circus aeruginosus</i>	Aguilucho lagunero
2	2	<i>Columba bollii</i>	Paloma turqué
1	0	<i>Columba livia</i>	Paloma bravía
13	2	<i>Columba junoniae</i>	Paloma rabiche
5	0	<i>Corvus corax</i>	Cuervo
1	0	<i>Cuculus canorus</i>	Cuco común
2	0	<i>Cyanopsitta spixii</i>	Guacamayo de spix
1	0	<i>Dendrocopos major</i>	Pico picapinos
3	0	<i>Egretta garcetta</i>	Garceta común
2	2	<i>Falco naumanni</i>	Cernícalo primilla
8	2	<i>Falco pelegrinoides</i>	Halcón de tagarote
58	42	<i>Falco tinnunculus</i>	Cernícalo vulgar
1	1	<i>Fratercula arctica</i>	Frailecillo común
3	0	<i>Fringilla teydea polatzequi</i>	Pinzón azul de Gran Canaria
1	0	<i>Fringilla teydea teydea</i>	Pinzón azul de Tenerife
6	0	<i>Fulica cristata</i>	Focha cornuda
1	1	<i>Fulmar glaciaris</i>	Fulmar
3	0	<i>Gallinula chloropus</i>	Gallineta común
2	2	<i>Gyps fulvus</i>	Buitre leonado
1	1	<i>Gypaetus barbatus</i>	Quebrantahuesos
14	2	<i>Hieraaetus fasciatus</i>	Águila azor-perdicera
3	0	<i>Hieraaetus pennatus</i>	Águila calzada
1	0	<i>Ixobrychus minutus</i>	Avetorillo común
12	0	<i>Lanius minor</i>	Alcaudón chico
53	31	<i>Larus michahellis</i>	Gaviota patiamarilla
3	2	<i>Larus ridibundus</i>	Gaviota reidora
1	0	<i>Merops apiaster</i>	Abejaruco común
2	1	<i>Milvus migrans</i>	Milano negro
4	1	<i>Morus bassanus</i>	Alcatraz común
1	0	<i>Myopssita monachus</i>	Cotorra de pecho gris
1	1	<i>Neophron monachus</i>	Alimoche encapuchado
13	7	<i>Neophron percnopterus majorensis</i>	Alimoche de Fuerteventura

5	0	<i>Numenius phaeopus</i>	Zarapito trinador
2	2	<i>Nycticorax nycticorax</i>	Martinete común
1	0	<i>Oriolus oriolus</i>	Oropéndola
2	1	<i>Otus scops</i>	Autillo europeo
2	0	<i>Parabuteo unicinctus superior</i>	Halcón de harries
1	0	<i>Pavo cristatus</i>	Pavo real
1	0	<i>Porphyryla alleni</i>	Calamón de allen
1	0	<i>Psittacula krameri</i>	Cotorra de kramer
1	1	<i>Rissa tridactyla</i>	Gaviota tridáctila
1	0	<i>Scolopax rustirola</i>	Chocha perdíz
1	0	<i>Serinus canaria</i>	Canario
1	0	<i>Stercorarius parasiticus</i>	Págalo parásito
2	0	<i>Sterna hirundo</i>	Charrán común
4	0	<i>Sterna sandvicensis</i>	Charrán patinegro
8	7	<i>Streptopelia decaocto</i>	Tórtola turca
3	0	<i>Sturnus vulgaris</i>	Estornino pinto
16	0	<i>Turdus merula</i>	Mirlo común
1	0	<i>Turdus philomelos</i>	Zorzal común
13	1	<i>Tetrao urogallus</i>	Urogallo
14	3	<i>Tyto alba</i>	Lechuza común
10	5	<i>Upupa epops</i>	Abubilla

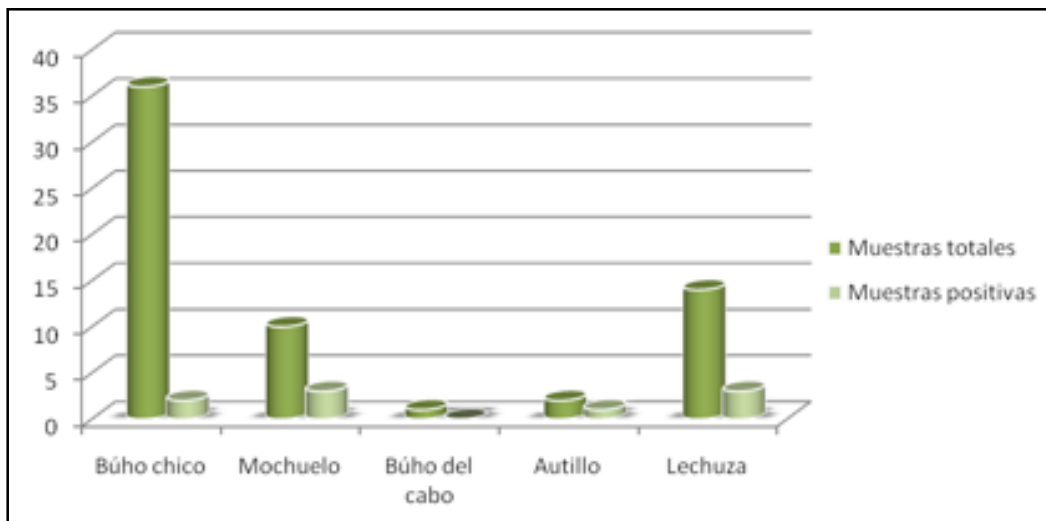
Gráfica 1:

Representación del porcentaje de micoplasmas aislados en aves rapaces.



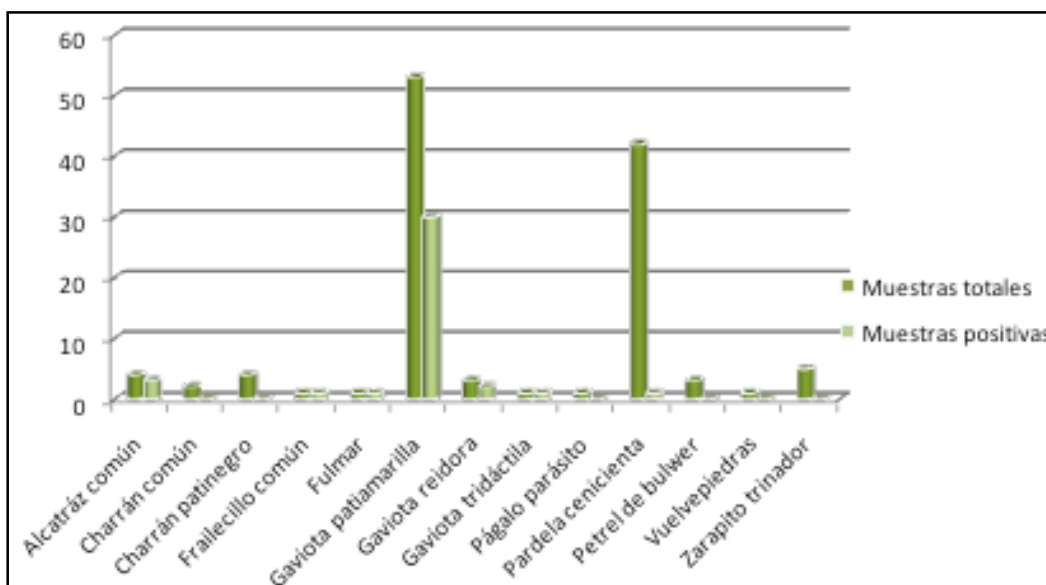
Gráfica 2:

Representación del número de muestras totales y positivas obtenidas en aves rapaces de hábitos nocturnos.



Gráfica 3:

Representación del número de muestras totales y positivas obtenidas en aves marinas.



La siguiente tabla (**Tabla 7**) muestra el número de aislamientos obtenidos en las diferentes aves del estudio y la causa de admisión de estos animales en los centros de recuperación:

Tabla 7 Relación de aislamientos con la causa de admisión.								
Especie								
	Nº aves	Inanición-debilidad	Caída de nido	Proyecto de cría	Intoxicación por sustancia tóxicas	Enfermedad	Traumatismos/Disparo/Electrocución/Trampas	Sin lesiones aparentes
<i>Accipiter nissus</i>	3						3	
<i>Aquila adalberti</i>	4			4				
<i>Aquila chrysaetos</i>	2			2				
<i>Ardea cinerea</i>	1	1						
<i>Asio otus</i>	2						1	1
<i>Athene noctua</i>	3		3					
<i>Burhinus oedicephalus</i>	17		2			3	10	2
<i>Buteo buteo</i>	12	1	2				8	1
<i>Calonectris diomedea</i>	1						1	
<i>Ciconia ciconia</i>	6	6						
<i>Ciconia nigra</i>	1		1					
<i>Circus gallicus</i>	2						2	
<i>Circus aeruginosus</i>	1		1					
<i>Columba bollii</i>	2					2		
<i>Columba junnoniae</i>	2			2				
<i>Falco naumanni</i>	2	2						
<i>Falco pelegrinoides</i>	2						2	
<i>Falco tinnunculus</i>	42	13	9			4	13	3
<i>Fratercula arctica</i>	1						1	
<i>Fulmar glacialis</i>	1	1						
<i>Gyps fulvus</i>	2	1					1	
<i>Gypaetus barbatus</i>	1			1				
<i>Hieraaetus fasciatus</i>	2			2				
<i>Larus michahellis</i>	31	3			20		8	
<i>Larus ridibundus</i>	2	2						
<i>Milvus migrans</i>	1							1
<i>Morus bassanus</i>	2	1					1	
<i>Neophron monachus</i>	1	1						
<i>Neophron percnopterus majorensis</i>	7				3	2	2	
<i>Nycticorax nycticorax</i>	2	1					1	
<i>Otus scops</i>	1	1						
<i>Rissa tridactyla</i>	1	1						
<i>Streptopelia decaocto</i>	7		2				5	
<i>Tetrao urogallus</i>	1			1				
<i>Tyto alba</i>	3	1					2	
<i>Upupa epops</i>	5					1	3	1

I.5.2. Características de los cultivos (morfología de las colonias).

En el 98,25 % de los aislamientos se observaron colonias típicas de micoplasmas en forma de huevo frito en los medios de cultivos PH o SP4-II entre 3 y 7 días de incubación a 37°C. En estas fotografías (**Figuras 1-14**) tomadas a algunos aislamientos del estudio se puede observar la variabilidad de formas, tamaños y coloración de las colonias en medio de cultivo PH:

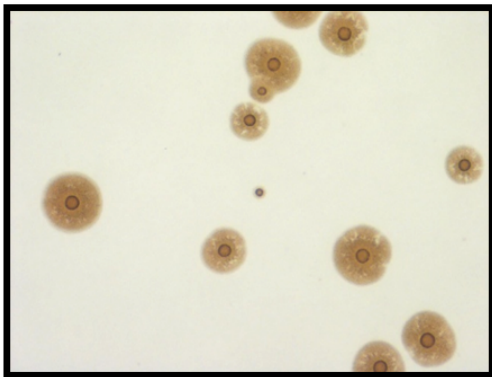


Figura 1: Micoplasmas aislados en *Falco peregrinoides* (40x)

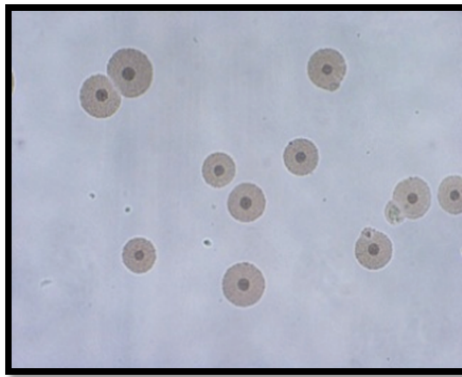


Figura 2: Micoplasmas aislados en *Falco tinnunculus* (40x)

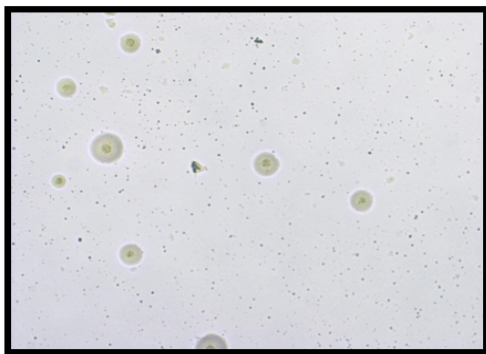


Figura 3: Micoplasmas aislados en *Burhinus oedicnemus* (40x)

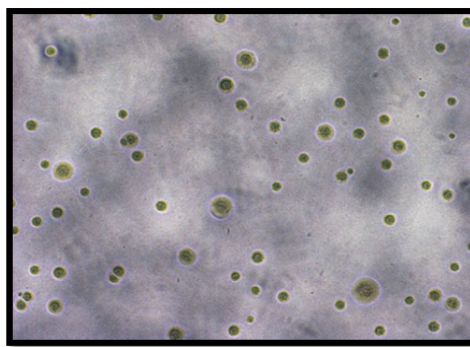


Figura 4: Micoplasmas aislados en *Columba bollii* (40x)



Figura 5: Micoplasmas aislados en *Columba junoniae* (40x)

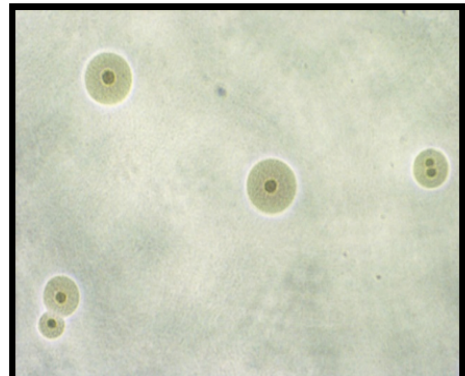


Figura 6: Micoplasmas aislados en *Ardea cinerea* (40x)

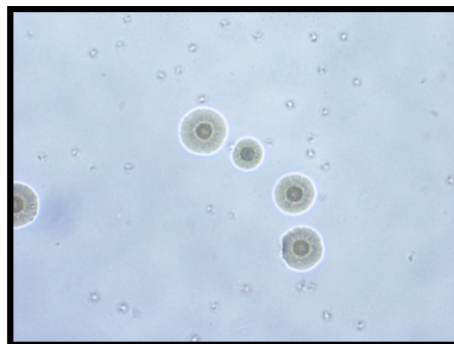


Figura 7: Micoplasmas aislados en *Larus ridibundus* (40x)

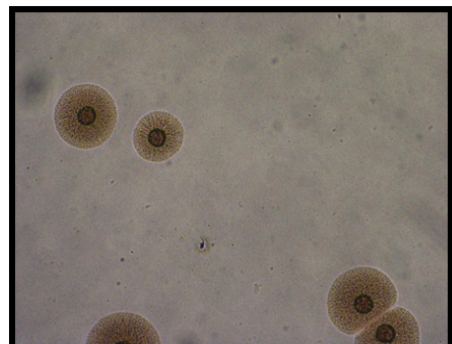


Figura 8: Micoplasmas aislados en *Milvus migrans* (40x)

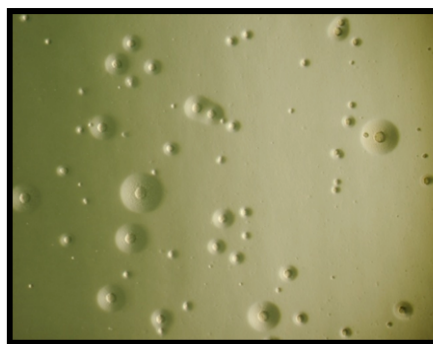


Figura 9: Micoplasmas aislados en *Larus michahellis* (40x)

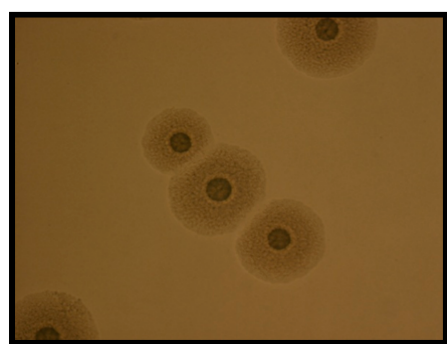


Figura 10: Micoplasmas aislados en *Neophron percnopterus majorensis* (40x)

I.5.3. Test de sensibilidad a la digitonina.

Todas las muestras que formaban colonias en los diferentes medios fueron sometidas a este test y todos los aislamientos mostraron una marcada sensibilidad frente a los discos de digitonina con un halo de inhibición mayor de 5 mm.

I.5.4. Pruebas bioquímicas y enzimáticas.

Ninguno de los aislamientos analizados mediante esta técnica hidrolizó la urea, y el resto de las características bioquímicas se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 8: Resultado de las pruebas bioquímicas y enzimáticas.						
ESPECIE	MUESTRA	TETRAZOLIUM	ARGININA	GLUCOSA	MANOSA	P + C
<i>Accipiter nissus</i>	T249T	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Si
	T533T	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Si
<i>Aquila adalberti</i>	T475T	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Si
	T479T	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	No
	T473T	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	No
	T485T	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Si
<i>Aquila chrysaetos</i>	T517T	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	No
<i>Ardea cinerea</i>	T136T	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	No
<i>Asio otus</i>	T12T	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	No
	T199T	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	No
<i>Athene noctua</i>	T500T, T501T	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Si
<i>Burhinus oedicnemus</i>	T138T, T110T, T59T, T77T, T166T, T362T T161T, T87T, T83T, T523T, T526T, T94T, T155T	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Si
	T4C	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	No
	T4T	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	No
	T245T	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	No
<i>Buteo buteo</i>	T58T, T81T, T89T, T18 3T, T106T.	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	No
	T384T, T233T ₁ , T6T, T329T	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Si
	T233T ₂ , T128T	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	No
	T326T	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Si

ESPECIE	MUESTRA	TETRAZOLIUM	ARGININA	GLUCOSA	MANOSA	P + C
<i>Calonectris diomedea</i>	T230T	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	No
<i>Ciconia ciconia</i>	T452T	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Si
	T453T	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	No
	T454T, T460T	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Si
	T465T, T511T	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	No
<i>Circaetus gallicus</i>	T457 CO	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	No
<i>Circus aeruginosus</i>	T469T	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Si
<i>Columba bollii</i>	T149SC, T2970	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Si
<i>Columba junoniae</i>	T156T	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Si
	T124T	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	No
<i>Falco naumanni</i>	T455T, T458T	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	No
<i>Falco pelegrinoides</i>	T187T	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	No
	T286T	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	No
<i>Falco tinnunculus</i>	T37C, T38T, T91T, T90T, T109T, T115T	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	No
	T463T, T63T, T42 T, T88Ce, T88T, T69T, T76T, T73T, T55T, T72T, T74T, T150T, T173T, T95T, T200T, T262T, T120T, T182T, T194T, T201T, T108T, T129T, T84T, T99T, T461T, T472T	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	No
	T159T, T101T, T236T, T316T, T462T, T359T, T219T, T111T, T43T, T169T	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Si

ESPECIE	MUESTRA	TETRAZOLIUM	ARGININA	GLUCOSA	MANOSA	P + C
<i>Fratercula arctica</i>	T398T	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	No
<i>Fulmar glaciaris</i>	T192T	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	No
<i>Gyps fulvus</i>	T494T	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	No
	T513CO	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	No
<i>Hieraaetus fasciatus</i>	T483T	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	No
<i>Larus michahellis</i>	T264T, T158T, T363T	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	No
	T355T, T256T, T240T, T98T, T247T, T195T, T400T, T275T, T179T, T177T, T261T, T349T, T278T, T244T, T283T, T356T, T391T, T402T	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Si
	T50T, T364T, T121T, T451T, T66T, T350T, T389T	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	No
	T164T	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Si
	T346T	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	No
<i>Larus ridibundus</i>	T265T	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	No
	T270T	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	No
<i>Milvus migrans</i>	T196T	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	No
<i>Morus bassanus</i>	T125T, T361T	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	No
<i>Neophron monachus</i>	T193T	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	No
<i>Neophron percnopterus majorensis</i>	T80T, T157T, T185T, T186T, T331T	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	No
	T344T, T534T	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Si
<i>Nycticorax nycticorax</i>	T310T	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	No
	T311T	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	No

ESPECIE	MUESTRA	TETRAZOLIUM	ARGININA	GLUCOSA	MANOSA	P + C
<i>Rissa tridactyla</i>	T396T	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	No
<i>Streptopelia decaocto</i>	T56T	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	No
	T260T, T287T, T403T, T535T, T536T	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Si
<i>Tyto alba</i>	T237T, T476T, T481T	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Si
<i>Upupa epops</i>	T41T, T65T, T93T	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	No
	T48T	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	No

I.5.5. Electroforesis de proteínas (SDS PAGE).

Esta prueba solo se desarrolló en el grupo de micoplasmas aislados en el cernícalo vulgar (*Falco tinnunculus*) por ser la especie con mayor número de aislamientos en el estudio y facilitar su posterior identificación con las pruebas definitivas.

Después de la realización de esta técnica se observó que el perfil de proteínas totales de los aislamientos T38T, T90T, T91T y T109T que hidrolizaban la arginina eran prácticamente idénticos y se diferenciaron de un segundo grupo mayoritario capaces de fermentar glucosa y manosa (T88T, T88C, T76T, T72T, T69T, T95T, T182T, T173T, T105T, T74T) y, por último, se observó un grupo formado por cuatro aislamientos (T236T, T159T, T43T, T101T) que no hidrolizaban la arginina ni fermentaban la glucosa (**Figura 15**).

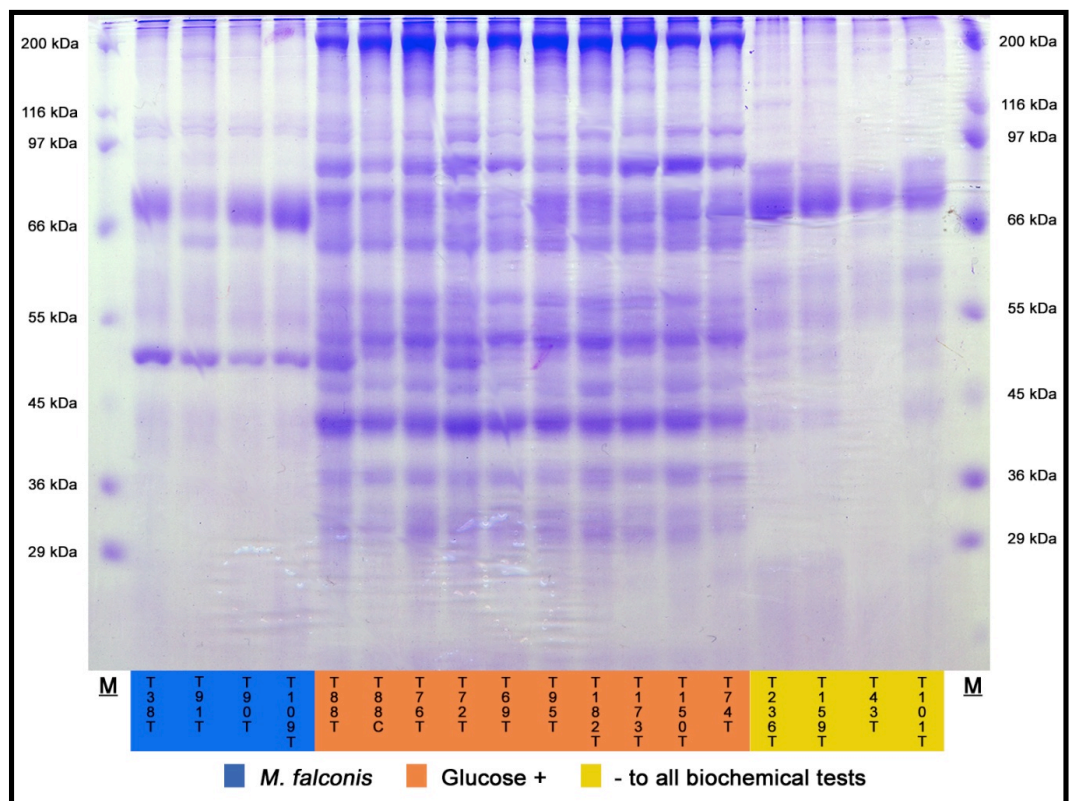


Figura 15: Perfil electroforético de proteínas totales obtenido mediante SDS-PAGE de aislamientos en la especie *Falco tinnunculus*.

I.5.6. Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización (DGGE).

Esta técnica se desarrolló en aquellas especies aviares cuyo número de aislamientos era muy elevado, como en los casos de las especies:

- Alcaraván (**Figuras: 17 y 25**).
- Gaviota patiamarilla (**Figuras: 18a, 18b y 21**).
- Cernícalo vulgar (**Figuras: 19 y 27**).
- Busardo ratonero (**Figuras: 20 y 25**).
- Cigüeña blanca (**Figura: 21**).
- Paloma rabiche y turqué, tórtola turca y gavián (**Figura: 22**).
- Lechuza común y mochuelo (**Figura: 23**).
- Abubilla (*Upupa epops*, **Figura: 24**).
- Águila imperial ibérica y Águila real (**Figura: 28**).
- Alimoche Canario (**Figuras: 25 y 29**).

En otras ocasiones, se compararon estos aislamientos con cepas de otras especies de interés cuyos perfiles bioquímicos eran similares y/o con controles positivos (cepas de referencia de micoplasmas aviares) de los que disponía el laboratorio y cuyo perfil de banda en esta técnica es conocido (**Figura 16**).

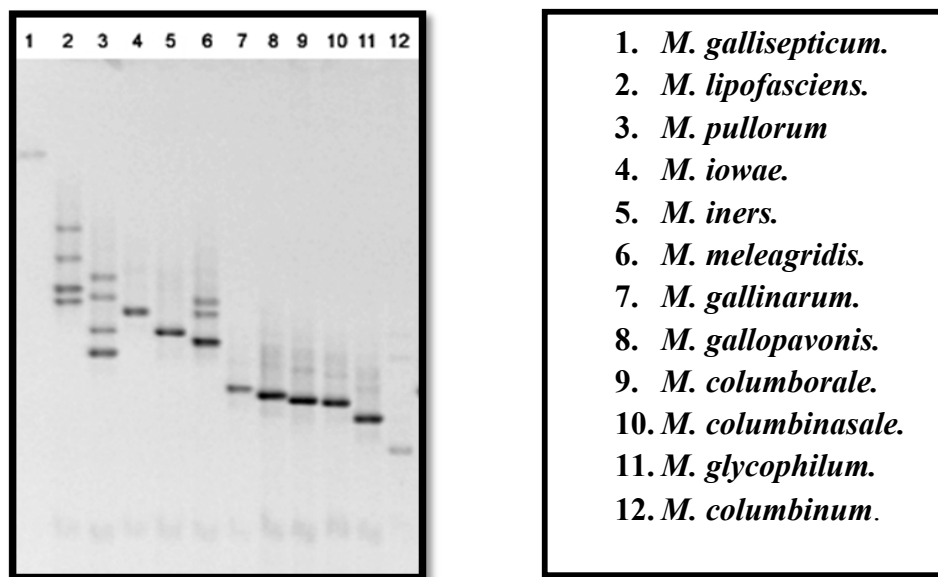
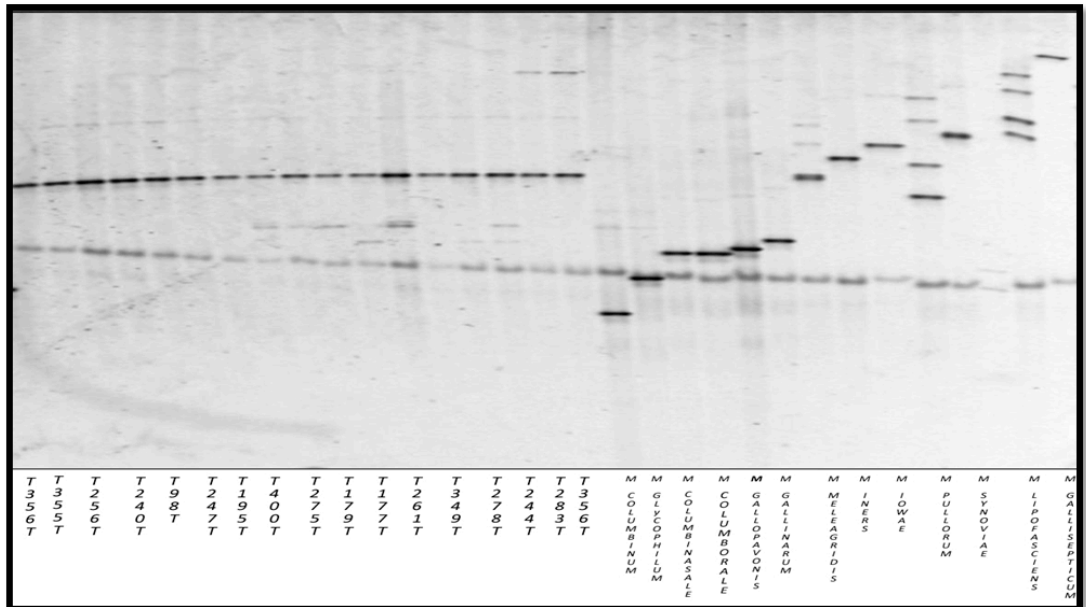


Figura 16: Controles positivos de micoplasmas aviares utilizados en este estudio.

Tras esta prueba se escogieron como cepas representativas para el estudio del gen ARNr 16S e ISR los aislamientos: T4T, T245T, T304T y T138T. La muestra T4C fue nuevamente clonada y posteriormente se procedió a la secuenciación del gen ARNr 16S de cada clon.

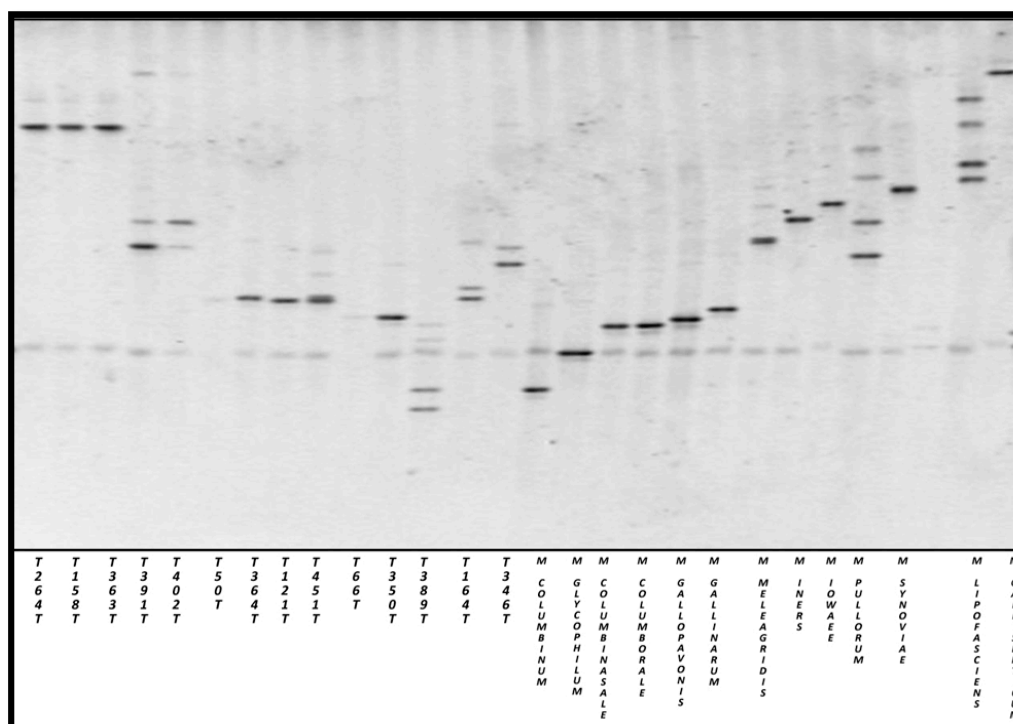
Figura 18a: DGGE de los micoplasmas aislados en la gaviota patiamarilla (*Larus michahellis*) y de los controles positivos.



Los aislamientos T356T, T355T, T256T, T240T, T98T, T247T, T195T, T400T, T275T, T179T, T177T, T261T, T349T, T278T, T244T, T283T, T365T mostraron un perfil similar en gel de DGGE.

Estos perfiles de DGGE no coincidieron con ninguno de los controles de micoplasmas aviares.

Figura 18b: DGEE de los micoplasmas aislados en la gaviota patiamarilla (*Larus michahellis*) y de los controles positivos.

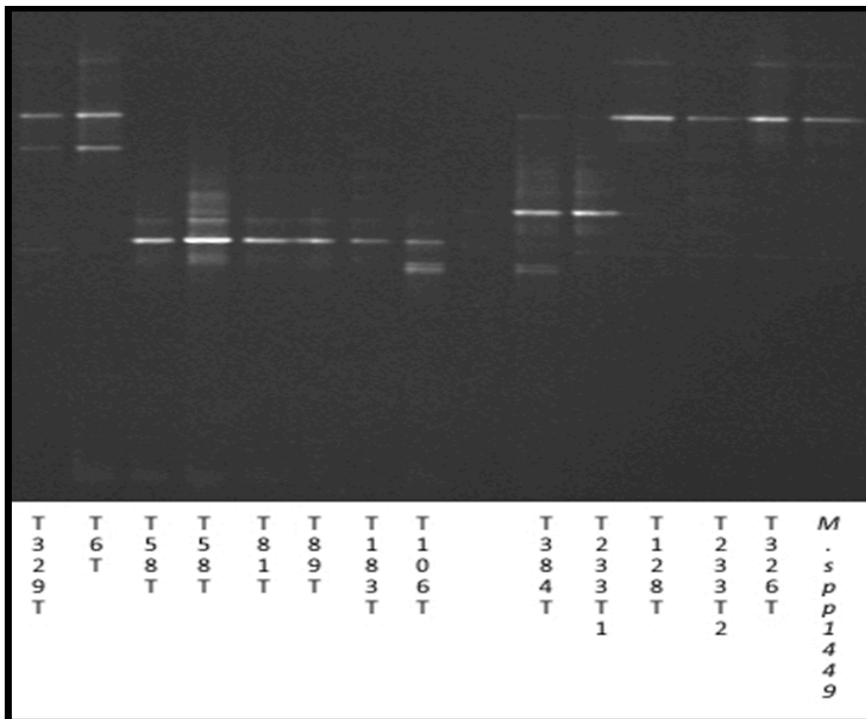


En este gel se observó la presencia de seis perfiles diferentes al grupo observado en la **Figura 18a**. El primer perfil estaba formado por los aislamientos T264T, T158T y T363T, el segundo por T391T y T402T, el tercero por T50T, T364T, T121T, T451T y el cuarto por T66T y T350T. Los aislamientos T389T, T164T y T346T mostraron un perfil diferente al resto.

Tras esta prueba se escogieron como cepas representativas para el estudio del gen ARNr 16S e ISR las cepas T98T, T158T, T391T, T50T, T350T, T389T, T164T, T346T.

Para el estudio del gen ARNr 16S e ISR se escogieron como cepas representativas los aislamientos T159T, T101T del primer grupo, los aislamientos T88C, T88T, T200T, T95T, T72T del segundo grupo y los aislamientos T90T, T91T, T109T del tercer grupo.

Figura 20: DGGE de los micoplasmas aislados en el busardo ratonero (*Buteo buteo*) y del *Mycoplasma spp.* 1449 (Höfle y cols., 2002).



Este gel mostró la presencia de tres grupos diferentes:

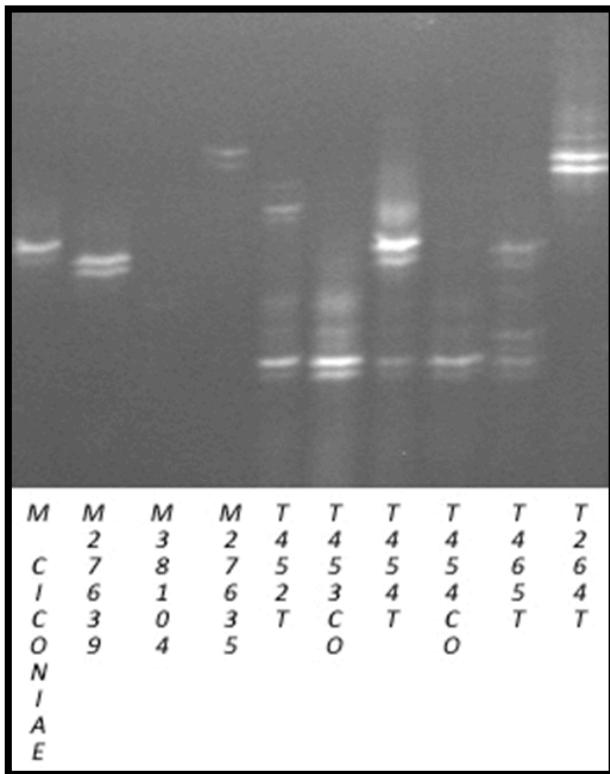
El primer grupo estaba formado por los aislamientos T329T, T6T, T128T, T233T₂, T326T que coincidían con el control *Mycoplasma spp.* 1449 cedido a nuestro laboratorio y que había sido aislado en un águila imperial ibérica (*Aquila adalberti*). El segundo

grupo estaba formado por los aislamientos T58T, T81T, T89T, T183T, T106T y el último grupo lo formaban por T384T y el T233T₁.

El aislamiento T233T originalmente presentaba dos bandas que posteriormente fueron clonadas e identificadas como dos micoplasmas diferentes (T233T₁ y T233T₂).

En este grupo decidimos tomar como cepas representativas para el estudio del gen ARNr 16S e ISR los aislamientos T6T, T233T₂, T326T, T128T, T58T, T106T, y T384T.

Figura 21: DGGE de los micoplasmas aislados en la cigüeña blanca, gaviota patiamarilla y del *M. ciconiae* (Sperger y cols., 2007), *M. spp.* 27639 (Poveda y cols., 2008), *M. spp.* 38104 (Poveda y cols., 2008) y *M. spp.* 27635 (Poveda y cols., 2008).



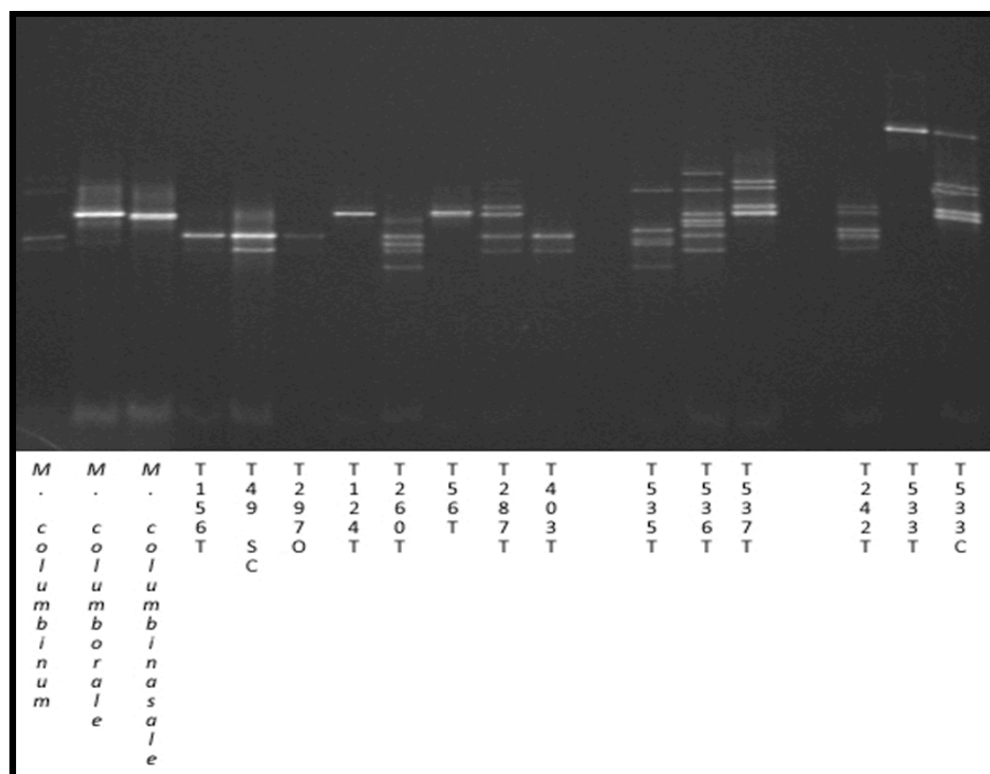
Este gel reveló que las cuatro muestras aisladas en la cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*) mostraban un movimiento similar de banda. El aislamiento T454T mostraba dos bandas, la superior coincidía con el control *Mycoplasma ciconiae* aislada anteriormente por los autores (Sperger y cols., 2007) en otra *Ciconia ciconia*.

Otra dato interesante observado en este gel fue el parecido de los perfiles de la

muestra T264T aislada en una gaviota patiamarilla (*Larus michahellis*) con la muestra *M. spp.* 27635 aislada en otra especie de gaviota (*Larus dominicanus vetula*). Estudios posteriores del gen ARNr 16S confirmaron que se trataba de la misma especie.

Posteriormente se analizó el ISR de las cepas T452T, T453CO, T454T de la especie *Ciconia ciconia*.

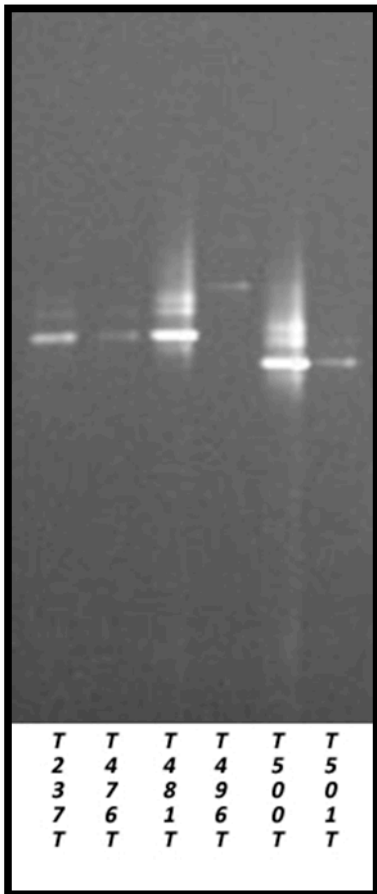
Figura 22: DGGE de los micoplasmas aislados en la paloma turqué, paloma rabiche, tórtola turca, gavián común (*Columba bollii*, *Columba junoniae*, *Streptopelia decaocto*, *Accipiter nissus*) y del *M. columbinum*, *M. columborale* y *M. columbinasale* (Shimizu y cols., 1978).



En este gel se observó el parecido que había entre los perfiles de banda de los aislamientos T156T, T149 SC, T297O y T403T con el control de *M. columbinum* y el de los aislamientos T124T y T56T con el control de *M. columborale*.

En los aislamientos T260T, T287T, T535T, T536T, T537T, T242T, T533C se observó la presencia de varias bandas que dificultó el análisis de los aislamientos mediante esta técnica.

Figura 23: DGEE de los micoplasmas aislados en la lechuga común y en el mochuelo europeo (*Tyto alba* y *Athene noctua*).



En este gel se observó que los perfiles en el gel de DGEE de los aislamientos de tres lechuzas comunes (T237T, T476T y T481T) eran similares, pero se diferenciaban de los aislamientos T496T, T500T y T501T de tres mochuelos europeos (*Athene noctua*).

Por otro lado, en la especie *Athene noctua* se diferenciaron dos grupos: los aislamientos T500T, T501T y el aislamiento T496T.

Los aislamientos que fueron seleccionados como cepas representativas para estudios del gen ARNr 16S e ISR fueron los aislamientos: T481T, T476T, T237T de la especie *Tyto alba* y los aislamientos T500T, T496T de la especie *Athene noctua*.

Figura 24: DGEE de los micoplasmas aislados en la abubilla (*Upupa epops*).

Este gel mostró que los cinco aislamientos en esta especie se diferenciaban en dos grupos según el perfil de banda en el gel de DGGE.

El primero estaba formado por los aislamientos T258T, T93T, T65T, T41T y el segundo por el aislamiento T48T, que mostraron un movimiento de banda diferente al resto.

En este caso en concreto se seleccionaron todas las cepas para el estudio del gen ARNr 16S e ISR.

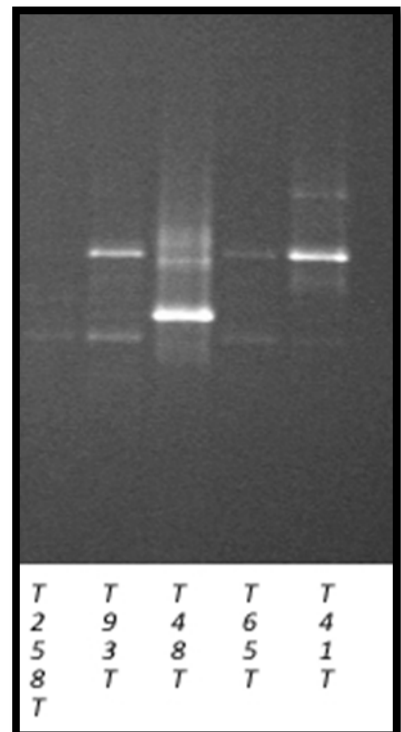
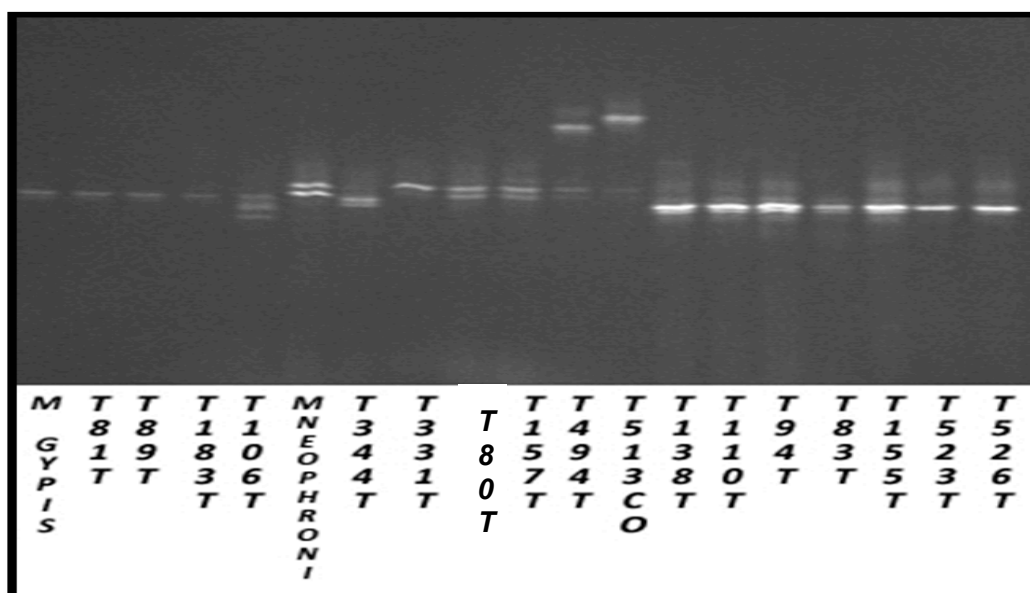


Figura 25: DGGE de micoplasmas aislados en las especies busardo ratonero, alimoche canario, buitre leonado, alcaraván común y del *Mycoplasma gypis* (Poveda y cols., 1994) y *Mycoplasma neophronis*.

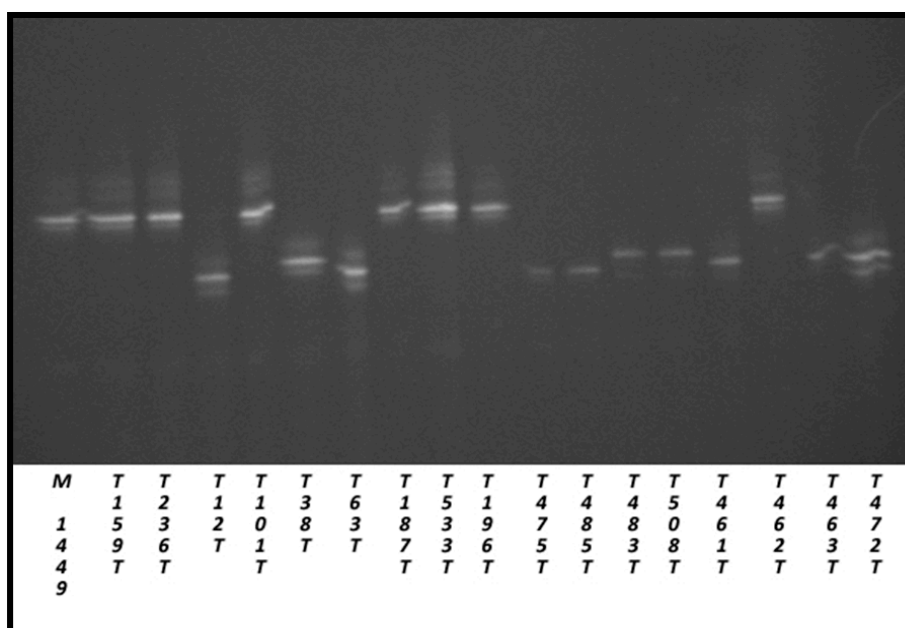


En este gel se compararon los aislamientos en estas especies aviares con el control de *M. gypis* y *M. neophronis*. Las cuatro muestras a la derecha del control de *M. gypis* fueron aisladas en el busardo ratonero (*Buteo buteo*) y por el lado contrario se observó que siete aislamientos de la especie alcaraván común (*Burhinus oedicephalus*) mostraban el mismo perfil. Todos ellos presentaron un perfil de banda similar al control de *M. gypis* y a su vez fueron similares al aislamiento T344T de la especie *Neophron percnopterus majorensis*.

Los aislamientos T331T, T80T y T157T fueron similares al control del *M. neophronis*. Los aislamientos de Buitre leonado (*Gyps fulvus* = T494T y T513CO) se diferenciaron entre sí y del resto de los aislamientos.

En este caso se escogió como cepa representativa para el estudio del gen ARNr 16S la muestra T138T dentro de la especie *Burhinus oedicnemus*.

Figura 26: DGGE de los micoplasmas aislados en el águila imperial, cernícalo vulgar, búho chico, halcón de tagarote, gavián, águila perdicera, águila culebrera y del *Mycoplasma spp.* 1449 (Höfle y cols., 2002).



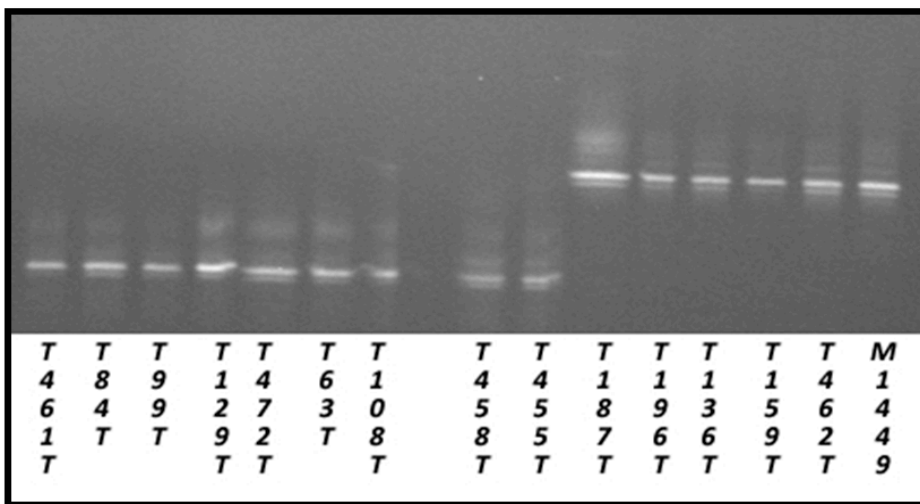
En este gel de DGGE se observó que los aislamientos T159T, T236T, T101T y T462T de cernícalo vulgar, el T187T de halcón tagarote, el T533T de gavián común y el T196T de la especie milano negro tenían un perfil de banda parecido al control *Mycoplasma spp.* 1449.

El segundo grupo estaba formado por los aislamientos T38T de cernícalo vulgar, T483T de águila perdicera y T508T de águila culebrera cuyo perfil de banda era similar.

Por último se observó que los aislamientos T12T de búho chico, T63T, T461T, T463T, T472T de cernícalo vulgar, T475T y T485T de águila imperial ibérica un mismo perfil de banda.

El gen ARNr 16S de las cepas T187T, T196T, T12T, T475T y T485T fue secuenciado posteriormente.

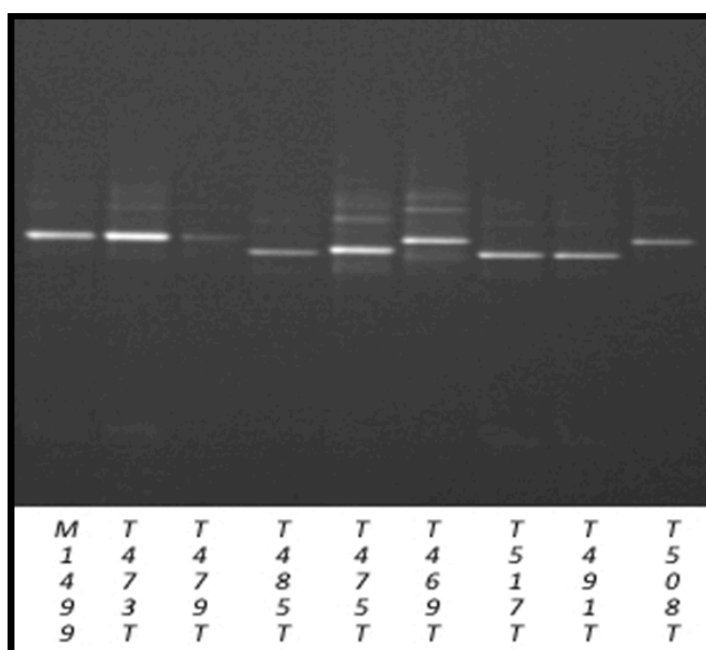
Figura 27: DGGE de micoplasmas aislados en el cernícalo vulgar, cernícalo primilla, garza real, milano negro y halcón tagarote y DGGE del *Mycoplasma* spp. 1449 (Höfle y cols., 2002).



En este gel se observaron claramente dos grupos diferenciados por el perfil de banda, pero lo más importante fue el aislamiento T136T de una garza real (*Ardea cinerea*) de perfil similar al de las cepas parecidas al *Mycoplasma* spp. 1449.

Por otro lado, los aislamientos T455T y T458T de la especie cernícalo primilla mostraban un perfil de banda similar al grupo mayoritario del aislamiento de la especie cernícalo vulgar. Estudios posteriores del gen ARNr 16S confirmaron estos resultados.

Figura 28: DGGE de micoplasmas aislados en águila imperial, aguilucho lagunero, águila real, águila culebrera y del *Mycoplasma* spp. 1449 (Höfle y cols., 2002).



En este gel fueron comparados los aislamientos de la especie águila imperial ibérica con el control *Mycoplasma* spp. 1449 (micoplasma aislado en la misma especie).

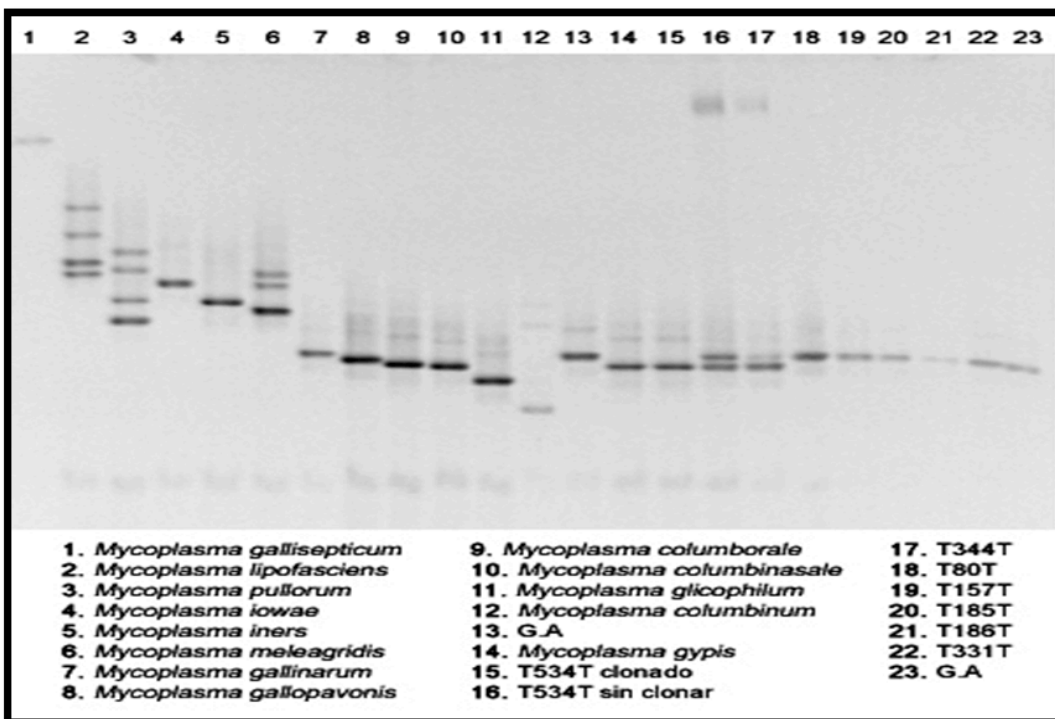
Los aislamientos T473T y T479T de águila imperial ibérica (*Aquila adalberti*) mostraron un perfil similar de banda al control *Mycoplasma* spp. 1449 pero los aislamientos T485T y T475T mostraron un perfil diferente.

Los aislamientos T469T de aguilucho lagunero (*Circus aeruginosus*) y T508T de águila culebrera (*Circaetus gallicus*) también mostraron un perfil de banda parecido al control *Mycoplasma* spp. 1449.

Los aislamientos T517T, T491T de águila real (*Aquila crysaetus*) tenían el mismo perfil de banda y similar al aislamiento T485T de águila imperial ibérica (*Aquila adalberti*).

Las cepas que fueron seleccionadas como muestras representativas para el estudio del gen ARNr 16S y/o ISR fueron: T517T, T491T, T469T y T479T.

Figura 29: DGGE de los micoplasmas aislados en la especie Alimoche canario (*Neophron percnopterus majorensis*) y de los controles positivos.



En este gel se observó claramente un grupo de cinco aislamientos (T80T, T157T, T185T, T186T y T331T) que mostraron un perfil similar de banda a la cepa de referencia (G.A.) de *Mycoplasma neophronis*.

Sin embargo, los aislamientos T344T y T534T tenían un perfil diferente al control *M. neophronis*, aunque coincidían con el control *Mycoplasma gypis*.

I.5.7. Prueba de inhibición de crecimiento.

La caracterización serológica mediante las pruebas de inhibición de crecimiento evidenció que las cepas T37C, T38T, T91T, T90T, T109T, T115T aisladas en la especie cernícalo vulgar (*Falco tinnunculus*), la cepa T483T aislada en águila azor-perdicera (*Hieraetus fasciatus*), la cepa T508T aislada en águila culebrera (*Circaetus gallicus*) y la cepa T4C aislada en alcaraván común (*Burhinus oedicephalus*) fueron inhibidas por el antisuero del *Mycoplasma falconis*.

Las cepa T156T aislada en paloma rabiche (*Columba junoniae*), las cepas T149SC y T297O aisladas en paloma turquí (*Columba bollii*), la cepa T389T aislada en gaviota patiamarilla (*Larus michahellis*), la cepa T249T aislada en gavilán (*Accipiter nissus*) y la cepa T403T aislada en tórtola turca (*Streptopelia decaocto*) fueron inhibidas por el antisuero de *Mycoplasma columbinum*.

La cepa T304T aislada en alcaraván común (*Burhinus oedicephalus*) fue inhibida por el antisuero del *Mycoplasma 72CL* aislado en un pelícano (*Pelecanus onocrotalus*) por Poveda y cols. (2008) y la cepa T4T aislada en otro alcaraván común (*Burhinus oedicephalus*) fue inhibida por el antisuero del *Mycoplasma iowae*. Por último la cepa T124T aislada en paloma rabiche (*Columba junoniae*) y la cepa T56T aislada en tórtola turca (*Streptopelia decaocto*) fueron inhibidas por el antisuero de *Mycoplasma columborale*.

I.5.8. Secuenciación y análisis filogenético del gen ARNr 16S y de la región intergénica (ISR).

La **Tabla 9** muestra los resultados obtenidos tras la comparación de las secuencias del gen ARNr 16S y regiones intergénicas (ISR) de las cepas representativas de nuestro estudio con la base de datos de secuencias de las mismas regiones en el Gene-Bank Database a través de la aplicación “on-line” del BLASTN 2.2.10 software. Estos resultados revelan una alta diversidad en la que la mayoría de las cepas muestran una homología mayor del 94% con micoplasmas descritos anteriormente y por otro lado, 21 aislamientos cuyo porcentaje de similitud es menor del 94 %.

Tabla 9: Porcentaje de homología tras la secuenciación del gen ARNr 16 e ISR.			
Especie	Cepa	Homología	Secuencia
Accipiter nissus	T533T	97 % <i>Mycoplasma</i> spp. 1449. FM196533.1	ISR
	T533C	92 % <i>Mycoplasma buteonis</i> strain Bb/T2g DQ847424.1	Gen ARNr 16S
	T249T	99 % <i>Mycoplasma columbinum</i> strain MMP-1 NR_025063.1	Gen ARNr 16s + ISR
Aquila adalberti	T475T	98 % <i>Mycoplasma gypis</i> strain ATCC 51370 AY816337.1	ISR
	T479T	94 % <i>Mycoplasma</i> spp. Sgv2c GQ150566.1	ISR
	T485T	98 % <i>Mycoplasma gypis</i> strain ATCC 51370 AY816337.1	ISR
Aquila crysaetus	T517T	98 % <i>Mycoplasma gypis</i> AY772219.1	ISR
	T491T	98 % <i>Mycoplasma gypis</i> AY772219.1	ISR
Ardea cinerea	T136T	97 % <i>Mycoplasma</i> spp. 1449, type strain 1449T. FM196533.1	Gen ARNr 16s + ISR
Asio otus	T12T	99 % <i>Mycoplasma</i> spp. M200-2 clone 2 EU684060.1	Gen ARNr 16S
	T199T	97 % <i>Mycoplasma spumans</i> AF538684.1	ISR
Athene noctua	T496T	87 % <i>Mycoplasma verecundum</i> AY781781.1.	ISR
	T500T	88 % <i>Mycoplasma lipofasciens</i> strain ATCC 35015 AY755604.1	ISR
Burhinus oedicnemus	T4C	100 % <i>Mycoplasma falconis</i> , type strain H/T1T. AJ780990.1	ISR
	T4T	100 % <i>Mycoplasma iowae</i> strain HTL04-4846A. EF447273.1	Gen ARNr 16s + ISR
	T245T	97 % <i>Mycoplasma spumans</i> AF538684.1	Gen ARNr 16s + ISR
	T304T	99 % <i>Mycoplasma</i> spp. 72CL, strain 72CL. FM878039.1	Gen ARNr 16s + ISR
	T138T	98 % <i>Mycoplasma gypis</i> strain B1/T1 NR_024982.1	Gen ARNr 16s + ISR

Buteo buteo	T106T, T58T	99% <i>Mycoplasma gypis</i> strain B1/T1 NR_024982.1	Gen ARNr 16s + ISR
	T384T	<i>Mycoplasma spp.</i> (Doble secuenciación)	
	T6T	99 % <i>Mycoplasma spp. Sgv1b</i> GQ150563.1	Gen ARNr 16s + ISR
	T233T ₂ , T128T	96 % <i>Mycoplasma spp. 1449</i> FM196532.1	ISR
	T326T	98 % <i>Mycoplasma spp. 1449</i> FM196532.1	ISR
Calonectris diomedea	T230T	95 % <i>Mycoplasma imitans</i> AB098503.1	ISR
Ciconia ciconia	T454T	94 % <i>Mycoplasma felifaucium</i> strain PU AY779746.1	ISR
	T452T	92 % <i>Mycoplasma spp. 1449</i> . FM196533.1	ISR
	T453 CO	93 % <i>Mycoplasma spumans</i> AF538684.1	ISR
Ciconia nigra	T495 CO	91 % <i>Mycoplasma felifaucium</i> strain PU 16S AY779746.1	ISR
Circaetus gallicus	T457 CO	94 % <i>Mycoplasma spp. Sgv2c</i> GQ150566.1	ISR
Circus aeruginosus	T469T	92 % <i>Mycoplasma buteonis</i> strain Bb/T2g DQ847424.1	ISR
Falco naumanni	T455T	92 % <i>Mycoplasma buteonis</i> strain Bb/T2g DQ847424.1	ISR
	T458T	91 % <i>Mycoplasma buteonis</i> strain Bb/T2g DQ847424.1	ISR
Falco pelegrinoides	T187T	99 % <i>Mycoplasma spp. SF9 16S</i> EU544228.1	Gen ARNr 16S
	T286T	92 % <i>Mycoplasma buteonis</i> strain Bb/T2g DQ847424.1	ISR
Falco tinnunculus	T90T, T91T, T109T	100 % <i>Mycoplasma spp. M221-9</i> clone 2 EU684059.1	Gen ARNr 16s + ISR
	T88C, T88T, T200T, T95T, T72T	99 % <i>Mycoplasma spp. M200-2</i> EU684060.1	Gen ARNr 16S
	T159T, T101T	99 % <i>Mycoplasma spp. M222-5</i> clone 1 EU684058.1	Gen ARNr 16s + ISR
Fratercula arctica	T398T	94 % <i>Mycoplasma corogypsi</i> strain BV1 NR_025896.1	Gen ARNr 16s + ISR
Fulmar glaciaris	T192T	95 % <i>Mycoplasma canadense</i> strain 466 EU92558.1	Gen ARNr 16s + ISR
Gypaetus barbatus	T549T	95 % <i>Mycoplasma spumans</i> AF538684.1	ISR
Gyps fulvus	T513 CO	99 % <i>Mycoplasma spp. Sgv1a</i> GQ150562.1	ISR
	T494T	<i>Mycoplasma spp.</i> (Doble secuenciación).	
Hieraetus fasciatus	T550T	92 % <i>Mycoplasma falconis</i> ATCC 51372 AY766087.1	ISR

Larus michahellis	T158T, T264T	99 % <i>Mycoplasma spp. 27635</i> strain 27635 FM878638.1	Gen ARNr 16s + ISR
	T98T	97 % <i>Mycoplasma spp. 39CL</i> strain 39CL AM182895.1	ISR
	T391T	97 % <i>Mycoplasma maculosum</i> strain Skotti B FJ595090.1	Gen 16s + ISR
	T50T	96 % <i>Mycoplasma spp. 13CL</i> AM182891.1	Gen 16s + ISR
	T350T	96 % <i>Mycoplasma spumans</i> AF538684.1	Gen 16s + ISR
	T164T	95 % <i>Mycoplasma spumans</i> AF538684.1	ISR
	T389T	100 % <i>Mycoplasma columbinum</i> AY729928.1	ISR
	T346T	99 % <i>Mycoplasma spp. 38104</i> strain 38104 FM878637.1	Gen ARNr 16s + ISR
Larus ridibundus	T265T	99 % <i>Mycoplasma spp. 38104</i> strain 38104 FM878637.1	Gen 16S
	T270T	89 % <i>Mycoplasma spp. A1802</i> FM196529.1	ISR
Milvus migrans	T196T	99 % <i>Mycoplasma spp. Sgv1b</i> GQ150563.1	Gen ARNr 16s + ISR
Morus bassanus	T125T, T361T	96 % <i>Mycoplasma spp. 10T4</i> strain 10T4. AM182896.1	Gen ARNr 16s + ISR
Neophron monachus	T193T	99 % <i>Mycoplasma spp. 1449</i> FM196533.1	ISR
Nycticorax nycticorax	T311T	95 % <i>Mycoplasma columborale</i> strain FG298 EU859978.1	Gen ARNr 16S
Otus scops	T459T	95 % <i>Mycoplasma spp. Sp22</i> FN394055.1	Gen ARNr 16S + ISR
Rissa tridactyla	T396T	98 % <i>Mycoplasma phocicerebrale</i> strain CSL 5195S2 DQ840513.1	Gen ARNr 16S
Tetrao urogallus	T541T	92 % <i>Mycoplasma maculosum</i> strain Skotti B FJ595090.1	ISR
Tyto alba	T237T, T476T, T481T	96 % <i>Mycoplasma iners</i> strain 89R-D-3 FJ666133.1	Gen ARNr 16S + ISR
Upupa epops	T41T, T65T	86 % <i>Mycoplasma leonicaptivi</i> strain ATCC 49890 AY755603.1	ISR
	T93T	84 % <i>Mycoplasma sp. CSL7529-conjunctiva</i> EU859984.1	ISR
	T48T	92 % <i>Mycoplasma gallapavonis</i> type strain WR1T. AJ780993.1	ISR

Las secuencias completas están detalladas en el **Anexo**: Secuencia de nucleótidos de las cepas del estudio.

Tras la comparación de las secuencias obtenidas en este estudio con las de la base de datos *GenBank Database*, se comprobó la presencia de cuatro grupos de aislamientos en aves rapaces que guardan un alto porcentaje de similitud entre ellos y a su vez con micoplasmas descritos anteriormente.

Las secuencias de las regiones intergénicas (ISR) de estos aislamientos en rapaces fueron utilizadas para la construcción de árboles filogenéticos y matrices de porcentajes de similitudes. De esta manera se intentó profundizar en la relación de parentesco entre estos micoplasmas.

El **primer grupo** lo formaban los aislamientos T479T de *Aquila adalberti*, T109T, T90T, T91T de *Falco tinnunculus*, T457T de *Circaetus gallicus*, T491T de *Aquila crysaetus* y T550T de *Hiraaetus fasciatus* que tenían un alto porcentaje de similitud con el *Mycoplasma Sgv2c* aislado en un *Gyps fulvus* por Lecis y cols., (2010a), con el *Mycoplasma falconis* aislado en un *Falco cherrug* por Poveda y cols., (1994) y con el *Mycoplasma spp. M221-9* clone 2 aislado en un *Falco naumanni* por Lierz y cols., (2008). *Mycoplasma falconis* y *Mycoplasma spp. M221-9 clone 2* guardan un 100% de similitud por lo que se les consideró la misma especie bacteriana.

El árbol filogenético resultante (**Figura 31**) de los análisis de las secuencias intergénicas confirmaron que los aislamientos de *Falco tinnunculus* T90T, T91T, T109T y *Mycoplasma falconis* eran la misma especie, al igual que los aislamientos T491T de *Aquila crysaetus* y el aislamiento T550T de *Hiraaetus fasciatus* guardaban un alto porcentaje de similitud con el *Mycoplasma Sgv2c*.

Por otro lado se observó el alto grado de similitud entre los aislamientos T479T de *Aquila adalberti* y el aislamiento T457T de *Circaetus gallicus*.

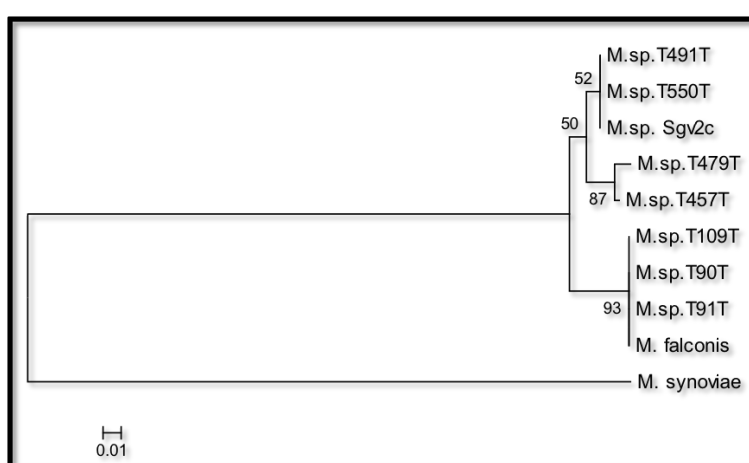


Figura 31:

Árbol filogenético resultante de los análisis de las ISR donde se muestran las posiciones de los aislamientos del primer grupo, utilizando como referencia a *M. synoviae*.

Secuencias Región intergénica ISR	T479T	T109T	T457T	T491T	T550T	T90T	T91T	<i>M. falconis</i>	<i>M.sp. Sgv2c</i>
T479T <i>Aquila adalberti</i>									
T109T <i>Falco tinnunculus</i>	88,3 %								
T457T <i>Circaetus gallicus</i>	95,4 %	88,3 %							
T491T <i>Aquila crysaetus</i>	92,4 %	91,3 %	93,9 %						
T550T <i>Hiraeetus fasciatus</i>	91,9 %	90,8 %	93,4 %	99,4 %					
T90T <i>Falco tinnunculus</i>	88,3 %	100 %	88,3 %	91,3 %	90,8 %				
T91T <i>Falco tinnunculus</i>	88,3 %	100 %	88,3 %	91,3 %	90,8 %	100 %			
<i>Mycoplasma falconis</i>	88,3 %	100 %	88,3 %	91,3 %	90,8 %	100 %	100 %		
<i>M.sp. Sgv2c</i>	92,4 %	89,3 %	93,9 %	97,9 %	97,4 %	89,3 %	89,3 %	89,3 %	

Tabla 10: Matriz de porcentajes de similitudes de las regiones intergenicas ISR del primer grupo de micoplasmas (aves rapaces).

El **segundo grupo** lo formaban los aislamientos T106T, T58T de la especie *Buteo buteo*, T475T, T485T de *Aquila adalberti*, T517T de *Aquila crysaetus* y el T138T de *Burhinus oedicephalus* que guardaban un alto porcentaje de similitud con el *Mycoplasma gypis* al comparar sus regiones intergénicas. El árbol filogenético resultante (**Figura 32**) de los análisis de las secuencias intergénicas confirmó que los aislamientos T106T y T58T de *Buteo buteo* eran la misma especie y que los aislamientos T485T, T475T de *Aquila adalberti* eran iguales al aislamiento T517T del *Aquila crysaetus*. Sin embargo, el aislamiento T138T de *Burhinus oedicephalus* se diferenció bastante del resto de los aislamientos de este grupo y del *Mycoplasma gypis*.

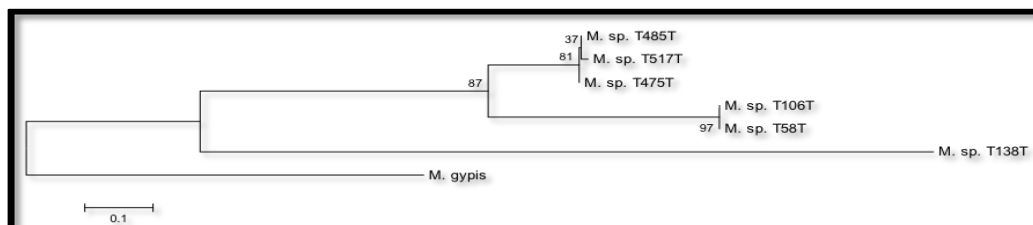


Figura 32: Árbol filogenético resultante de los análisis de las secuencias de la ISR, en el que se muestran las posiciones de los aislamientos del segundo grupo.

Secuencias Región intergénica ISR	T106T	T58T	T475T	T485T	T517T	T138T	<i>M. gypis</i>
T106T <i>Buteo buteo</i>							
T58T <i>Buteo buteo</i>	100 %						
T475T <i>Aquila adalberti</i>	94,3 %	94,3 %					
T485T <i>Aquila adalberti</i>	94,3 %	94,3 %	100 %				
T517T <i>Aquila crysaetus</i>	94,3 %	94,3 %	99,5 %	99,5 %			
T138T <i>Burhinus oedicephalus</i>	77,9 %	77,9 %	79 %	79 %	79 %		
<i>Mycoplasma gypis</i>	94,3 %	94,3 %	97,3 %	97,3 %	97,3 %	80,5 %	

Tabla 11: Matriz de porcentajes de similitudes de las regiones intergénicas ISR del segundo grupo de micoplasmas (micoplasmas parecidos a *M. gypis*).

El **tercer grupo**, lo formaron los aislamientos T455T y T458T de *Falco naumanni* y los aislamientos T88T, T95T, T200T, T88C de *Falco tinnunculus* que guardaron un fuerte parecido con el *Mycoplasma buteonis* tras comparar sus regiones intergénicas.

El árbol filogenético resultante (**Figura 33**) de los análisis de la secuencias intergénicas confirmó que todos los aislamientos eran la misma especie pero que se diferenciaban claramente del *Mycoplasma buteonis*.

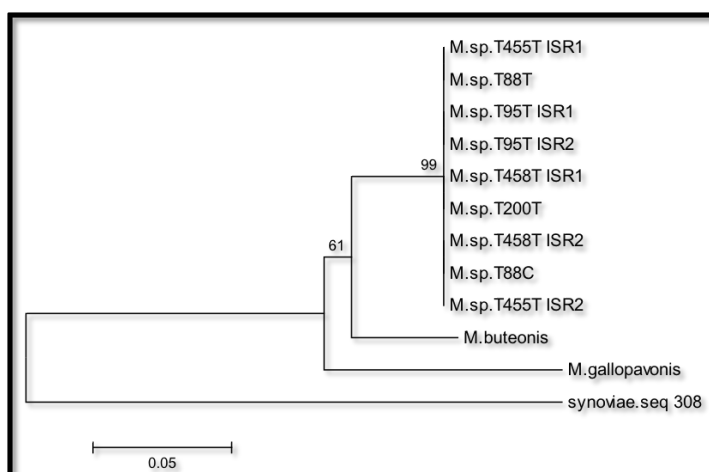


Figura 33:

Árbol filogenético resultante de los análisis de las secuencias ISR, en el que se muestran las posiciones de los aislamientos del tercer grupo.

Secuencias Región intergénica (ISR)	T455T ₁ <i>F. naumanni</i>	T455T ₂ <i>F. naumanni</i>	T458T ₁ <i>F. naumanni</i>	T458T ₂ <i>F. naumanni</i>	T88T <i>F. tinnunculus</i>	T200T <i>F. tinnunculus</i>	T95T ₁ <i>F. tinnunculus</i>	T95T ₂ <i>F. tinnunculus</i>	T88C <i>F. tinnunculus</i>	<i>M. buteonis</i>	<i>M. gallopavonis</i>
T455T ₁											
T455T ₂	99,3										
T458T ₁	99,3	98,6									
T458T ₂	98,6	98,6	99,3								
T88T	98,6	99,3	98,3	98,3							
T200T	98	98,6	97,6	97,6	99,3						
T95T ₁	98,3	98,9	98	97,9	98,9	98,3					
T95T ₂	97,6	98,3	97,3	97,3	98,3	97,6	99,3				
T88C	98,6	99,3	98,3	98,3	100	99,3	98,9	98,3			
<i>M. buteonis</i>	89,5	90,1	89,2	89,8	90,1	89,8	90,1	90,1	90,1		
<i>M. gallopavonis</i>	82	82	82	82	82,3	82	81,6	81,3	82,3	80,7	

Tabla 12: Matriz de porcentajes de similitudes de las regiones intergénicas ISR del tercer grupo de micoplasmas (micoplasmas parecidos a *M. buteonis*).

El **cuarto grupo** lo formaban muchos micoplasmas aislados en varias especies: T101T y T159T de *Falco tinnunculus*, T513CO de *Gyps fulvus*, T196T de *Milvus migrans*, T326T, T128T y T233T₂ de *Buteo buteo*, T193T de *Neophron monachus*, T187T de *Falco pelegrinoides* y T533T de *Accipiter nissus*. Todos estas aislamientos guardaron una alto porcentaje de similitud con *Mycoplasma verecundum* aislado por Gourlay y cols. (1974), *Mycoplasma Sgv 1* aislado por Lecis y cols. (2010a) en *Gyps fulvus* y con *Mycoplasma spp. 1449* aislado Höfle y cols. (2002) en *Aquila adalberti*.

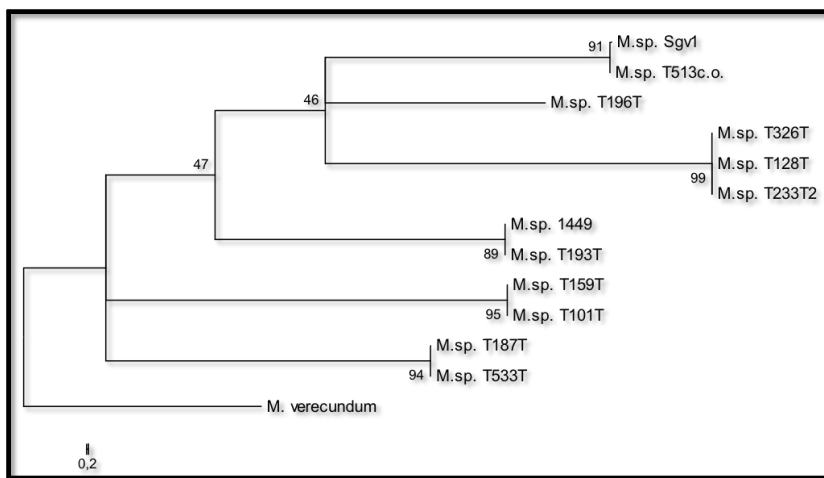


Figura 34:

Árbol filogenético resultante de los análisis de las secuencias de la regiones intergénicas ISR el que se muestran las posiciones de los aislamientos del cuarto grupo.

El árbol filogenético resultante (**Figura 34**) de los análisis de la secuencias intergénicas confirmó que todos los aislamientos están muy relacionados entre sí pero no con el *Mycoplasma verecundum*. Por otro lado el aislamiento T513CO de la especie *Gyps fulvus* era la misma especie que el *Mycoplasma Sgv1* y que los aislamientos T326T, T128T y T233T₂ de la especie *Buteo buteo*.

Además, el aislamiento T193T de *Neophron monachus* era igual al *Mycoplasma spp. 1449* y los aislamientos en *Falco tinnunculus* T101T y T159T eran iguales entre sí. Por último, se observó que el micoplasma aislado en *Falco pelegrinoides* T187T y *Accipiter nissus* T533T eran la misma especie.

Secuencias Región intergénica ISR	<i>M. verecundum</i>	M. spp. 1449	M. Sgv1	T128T	T187T	T326T	T196T	T513CO	T159T	T233T ₂	T533T	T101T	T193T
<i>M. verecundum</i>													
M. spp. 1449	88,3												
M. Sgv1	86	95,5											
T128T	88,7	96,2	96,3										
T187T	86,5	94,2	91,7	92,4									
T326T	88,7	96,2	96,3	100	92,4								
T196T	85,5	94,8	93,8	91,6	90,1	91,6							
T513CO	86	95,5	99,2	96,3	91,7	96,3	93,8						
T159T	85,5	89	89,2	89,8	90,8	89,8	85,1	89,2					
T233T ₂	88,7	96,2	96,3	100	92,4	100	91,6	96,3	89,8				
T533T	86,8	95	92,5	93,2	99,2	93,2	90,8	92,5	91,5	93,2			
T101T	85,5	89	89,2	89,8	90,8	89,8	85,1	89,2	100	89,8	91,5		
T193T	88,3	99,6	95,5	96,2	94,6	96,2	95,2	95,5	89	96,2	95,4	89	

Tabla 13: Matriz de porcentajes de similitudes de las regiones intergénicas ISR del cuarto grupo de micoplasmas (micoplasmas parecidos a *M. verecundum*).

I.5.9. Resumen de los resultados.

En la siguiente tabla podemos observar los resultados obtenidos en las diferentes pruebas:

Especie	Muestra	DGGE	Estudio del gen ARNr 16 S	Estudio de la región intergénica ISR	Prueba de inhibición del crecimiento GI
Accipiter nissus	T249T		99 % <i>Mycoplasma columbinum</i> strain MMP-1 NR_025063.1		Antisuero- <i>Mycoplasma columbinum</i> .
	T533T	Perfil similar al <i>Mycoplasma spp.</i> 1449.		97 % <i>Mycoplasma spp.</i> 1449 FM196533.1.	
	T533C		92 % <i>M. buteonis</i> strain Bb/T2g DQ847424.1		
Aquila adalberti	T475T	Perfil similar al T485T.		98 % <i>Mycoplasma gypis</i> strain ATCC 51370 AY816337.1.	
	T485T	Perfil similar al T475T.		98 % <i>Mycoplasma gypis</i> strain ATCC 51370 AY816337.1.	
	T479T	Perfil similar al <i>Mycoplasma spp.</i> 1449.		94 % <i>Mycoplasma sp.</i> Sgv2c GQ150566.1	
	T473T	Perfil similar en la técnica DGGE y mismas características bioquímicas que <i>Mycoplasma spp.</i> 1449 y la cepa T479T.			
Aquila chrysaetos	T517T	Perfil similar a T485T aislado en águila imperial ibérica.		98 % <i>Mycoplasma gypis</i> 16S ribosomal AY772219.1.	
	T491T	Perfil similar a T485T aislado en águila imperial ibérica.		98 % <i>Mycoplasma gypis</i> 16S ribosomal AY772219.1.	
Ardea cinerea	T136T	Perfil similar al <i>Mycoplasma spp.</i> 1449.	97 % <i>Mycoplasma spp.</i> 1449 FM196533.1.		

Especie	Muestra	DGGE	Estudio del gen ARNr 16S	Estudio de la región intergénica ISR	Prueba de inhibición del crecimiento GI
Asio otus	T12T	Perfil similar al 2º grupo de aislamientos en rapaces.	99 % <i>Mycoplasma spp. M200-2</i> clone 2 EU684060.1.		
	T199T			97 % <i>Mycoplasma spumans</i> AF538684.1.	
Athene noctua	T496T	Perfil diferente a los otros aislamientos en esta especie.		87 % <i>Mycoplasma verecundum</i> AY781781.1.	
	T500T	Perfil similar al T501T.		88 % <i>Mycoplasma lipofaciens</i> strain ATCC 35015 AY755604.1.	
	T501T	Perfil similar en la técnica DGGE y mismas características bioquímicas que T500T.			
Burhinus oedicnemus	T4C	Perfil diferente a los otros aislamientos en esta especie.		100% <i>Mycoplasma falconis</i> H/T1T AJ780990.1.	Antisuero- <i>Mycoplasma falconis</i> .
	T4T	Perfil similar al <i>M. iowae</i> .	100 % <i>Mycoplasma iowae</i> HTL04-4846A EF447273.1.		Antisuero - <i>Mycoplasma iowae</i>
	T245T	Perfil diferente a los otros aislamientos en esta especie.	97% <i>Mycoplasma spumans</i> AF538684.1.		
	T304T	Perfil diferente a los otros aislamientos en esta especie.	99% <i>Mycoplasma spp. 72CL</i> FM878039.1.		Antisuero - <i>Mycoplasma spp. 72 CL</i> .
	T138T	Perfil diferente a los otros aislamientos en esta especie.	98 % <i>Mycoplasma gypis</i> strain B1/T1NR_024982.1.		
Las cepas: T110T, T59T, T77T, T166T, T362, T161T, T87T, T83T, T523T, T526T, T94T, T155T son similares al perfil de la cepa T138T en la técnica DGGE y con las mismas características bioquímicas.					

Especie	Muestra	DGGE	Estudio del gen ARNr 16S	Estudio de la región intergénica ISR	Prueba de inhibición del crecimiento GI
Buteo buteo	T58T	Similar al perfil de T106T.	99 % <i>Mycoplasma gypis strain B1/T1NR_024982.1.</i>		
	T106T	Similar al perfil de <i>Mycoplasma gypis.</i>	99 % <i>Mycoplasma gypis strain B1/T1NR_024982.1.</i>		
	Las cepas: T89T, T183T, T81T son similares al perfil de las cepas T58T y T106T en la técnica DGGE y con las mismas características bioquímicas.				
	T6T	Perfil similar a <i>Mycoplasma spp. 1449.</i>	99 % <i>Mycoplasma spp. Sgv1b GQ150563.1.</i>		
	T329T	Perfil similar a <i>Mycoplasma spp. 1449</i> por técnica DGGE y con las mismas características bioquímicas.			
	T233T₂ T128T	Perfil similar a <i>Mycoplasma spp. 1449.</i>	96 % <i>Mycoplasma spp. 1449 FM196533.1.</i>		
T326T	Perfil similar a <i>Mycoplasma spp. 1449.</i>	98 % <i>Mycoplasma spp. 1449 FM196533.1.</i>			
Calonectris diomedea	T230T		100% <i>Mycoplasma T264T</i> aislado en <i>Larus michahellis</i> ; 95 % <i>Mycoplasma imitans.</i>		
Ciconia ciconia	T454T	Perfil con dos bandas y una de ellas es similar al perfil de <i>M. ciconiae</i>	94 % <i>Mycoplasma felifaucium strain PU. AY779746.1.</i>		
	T452T	Perfil con dos bandas y una de ellas similar a T453CO	92 % <i>Mycoplasma sp. 1449 FM196533.1.</i>		
	T460T	Perfil similar al T454T en la técnica DGGE y tiene las mismas características bioquímicas.			
	T453CO	Perfil con una sola banda que coincide con T454CO	93 % <i>Mycoplasma spumans AF538684.1.</i>		
	T465T T511T	Perfiles similares al T453CO en la técnica DGGE y con las mismas características bioquímicas.			

Especie	Muestra	DGGE	Estudio del gen ARNr 16S	Estudio de la región intergénica ISR	Prueba de inhibición del crecimiento GI
<i>Ciconia nigra</i>	T495 CO			91 % <i>Mycoplasma felifaucium</i> strain PU 16S AY779746.	
<i>Circaetus gallicus</i>	T457 CO			94 % <i>Mycoplasma</i> spp. Sgv2c GQ150566.1.	
	T508T	Perfil similar a <i>Mycoplasma falconis</i> en la técnica DGGE y con las mismas características bioquímicas			Antisuero - <i>Mycoplasma falconis</i> .
<i>Circus aeruginosus</i>	T469T			92 % <i>Mycoplasma buteonis</i> strain Bb/T2g. DQ847424.1	
<i>Columba bolli</i>	T149SC	Perfil similar a <i>Mycoplasma columbinum</i> en la técnica DGGE y con las mismas características bioquímicas.			Antisuero - <i>Mycoplasma columbinum</i> .
	T297O	Perfil similar a <i>Mycoplasma columbinum</i> en la técnica DGGE y con las mismas características bioquímicas.			Antisuero - <i>Mycoplasma columbinum</i> .
<i>Columba junoninae</i>	T156T	Perfil similar a <i>Mycoplasma columbinum</i> en la técnica DGGE y con las mismas características bioquímicas.			Antisuero - <i>Mycoplasma columbinum</i> .
	T124T	Perfil similar a <i>Mycoplasma columborale</i> en la técnica DGGE y con las mismas características bioquímicas.			Antisuero - <i>Mycoplasma columborale</i> .
<i>Falco naumanni</i>	T455T	Perfil similar al 2º grupo de aislamientos en rapaces.		92 % <i>Mycoplasma buteonis</i> strain Bb/T2g DQ847424.1.	
	T458T	Perfil similar al 2º grupo de aislamientos en rapaces.		91 % <i>Mycoplasma buteonis</i> strain Bb/T2g DQ847424.1.	

Especie	Muestra	DGGE	Estudio del gen ARNr 16S	Estudio de la región intergénica ISR	Prueba de inhibición del crecimiento GI	
<i>Falco pelegrinoides</i>	T187T	Perfil similar al <i>Mycoplasma spp.</i> 1449.	99 % <i>Mycoplasma spp.</i> SF9 16S EU544228.1.			
	T286T			92% <i>Mycoplasma buteonis</i> strain Bb/T2g DQ847424.1.		
<i>Falco tinnunculus</i>	T91T, T90T, T109T	Perfil similar a <i>Mycoplasma falconis</i> .	99% <i>Mycoplasmas falconis</i> NR_024984.1 100% <i>Mycoplasma spp.</i> M221-9 clone 2 EU684059.1 y con las mismas características bioquímicas.		Antisuero - <i>Mycoplasma falconis</i> .	
	T37C, T38T, T115T	Perfil similar a <i>Mycoplasma falconis</i> en la técnica DGGE y con las mismas características bioquímicas.			Antisuero - <i>Mycoplasma falconis</i> .	
	T88 Ce, T88T, T72T, T95T, T200T	Perfil similar al 2º grupo de aislamientos en rapaces.	99 % <i>Mycoplasma spp.</i> M200-2 clone 2 EU684059.1.			
		Las cepas: T463T, T63T, T42T, T69T, T76T, T73T, T55T, T74T, T150T, T173T, T262T, T120T, T182T, T194T, T201T, T108T, T129T, T84T, T99T, T461T, T472T tienen perfiles similares al segundo grupo de aislamientos en aves rapaces en la técnica DGGE y con las mismas características bioquímicas.				
	T159T T101T	Perfil similar al <i>Mycoplasma spp.</i> 1449.	99 % <i>Mycoplasma spp.</i> M222-5 clone 1 EU684058.1.			
		Las cepas T236T, T316T, T462T, T359T, T219T, T169T tienen perfiles similares al tercer grupo de aislamientos en rapaces en la técnica DGGE y con las mismas características bioquímicas.				
<i>Fratercula arctica</i>	T398T		94 % <i>Mycoplasma corogyphi</i> strain BV1 NR_025896.1.			

Especie	Muestra	DGGE	Estudio del gen ARNr 16S	Estudio de la región intergénica ISR	Prueba de inhibición del crecimiento GI
<i>Fulmar glaciaris</i>	T192T		95 % <i>Mycoplasma canadense</i> strain 466 EU92558.1.		
<i>Gypaetus barbatus</i>	T549T			95 % <i>Mycoplasma spumans</i> AF538684.1.	
<i>Gyps fulvus</i>	T513CO			99 % <i>Mycoplasma spp. Sgv1a</i> GQ150562.1	
<i>Hieraetus fasciatus</i>	T483T	Perfil similar a <i>Mycoplasma falconis</i> en la técnica DGGE y con las mismas características bioquímicas.			Antisuero - <i>Mycoplasma falconis</i> .
	T550T			92 % <i>Mycoplasma falconis</i> ATCC 51372 AY766087.1	
<i>Larus michahellis</i>	T264T	Perfil similar a <i>Mycoplasma spp.</i> 27635.	99 % <i>M. spp.</i> 27635 strain 27635 FM878638.1 y 99 % <i>M. gallisepticum str. F, complete genome.</i> CP001873.1		
	T158T	Perfil similar a T264T.	99 % <i>M. spp.</i> 27635 strain 27635 FM878638.1. y 99 % <i>M. gallisepticum str. F, complete genome.</i> CP001873.1		
	T363T	Perfil similar a T264T.			
	T98T	Perfil diferente al de los otros aislamientos en esta especie.	100 % <i>Mycoplasma spp.</i> 27639 y 97 % <i>Mycoplasma sp. 39CL strain 39CL</i> AM182895.1.		
Las cepas T256T, T356T, T240T, T355T, T247T, T195T, T400T, T275T, T179T, T177T, T261T, T349T, T278T, T244T, T283T, T356T tienen perfiles similares a la cepa T98T en la técnica DGGE y con las mismas características bioquímicas.					

Especie	Muestra	DGGE	Estudio del gen ARNr 16S	Estudio de la región intergénica ISR	Prueba de inhibición del crecimiento GI
<i>Larus michahellis</i>	T391T	Perfil diferente al de los otros aislamientos en esta especie.	96 % <i>Mycoplasma maculosum strain Skotti FJ595090.1.</i>		
	T402T	Perfil similar a la cepa T391T en la técnica DGGE y con las mismas características bioquímicas.			
	T50T	Perfil similar al T391T.	96 % <i>Mycoplasma spp. 13CL AM182891.1.</i>		
	T364T, T121T, T451T son similares al perfil de la cepa T50T en la técnica DGGE y con las mismas características bioquímicas.				
	T350T	Perfil diferente al de los otros aislamientos en esta especie	96 % <i>Mycoplasma spumans AF538684.1.</i>		
	T66T	Perfil similar al T350T en la técnica DGGE y con las mismas características bioquímicas.			
	T389T	Perfil diferente al de los otros aislamientos en esta especie.	100 % <i>Mycoplasma columbinum.</i>		Antisuero - <i>Mycoplasma columbinum.</i>
	T164T	Perfil diferente al de los otros aislamientos en esta especie.		95 % <i>Mycoplasma spumans AF538684.1.</i>	
	T346T	Perfil diferente al de los otros aislamientos en esta especie.	99 % <i>Mycoplasma spp. 38104 strain 38104 FM878637.1.</i>		

Especie	Muestra	DGGE	Estudio del gen ARNr 16S	Estudio de la región intergénica ISR	Prueba de inhibición del crecimiento GI
<i>Larus ridibundus</i>	T265T		99 % Mycoplasma spp. 38104 FM878637.1.		
	T270T			89 % <i>Mycoplasma</i> spp. A1802 FM196529.1.	
<i>Milvus migrans</i>	T196T	Perfil similar al <i>Mycoplasma</i> spp. 1449.	99 % <i>Mycoplasma</i> spp 1449 FM196532.1 y 99 % <i>Mycoplasma</i> spp. Sgv1b GQ150563.1.		
<i>Morus bassanus</i>	T125T T361T		96 % <i>Mycoplasma</i> spp. 10T4, strain 10T4. AM182896.1.		
<i>Neophron monachus</i>	T193T	Perfil similar al <i>Mycoplasma</i> spp. 1449.		99 % <i>Mycoplasma</i> spp. 1449 FM196532.1.	
<i>Neophron percnopterus majorensis</i>	Las cepas: T80T, T157T, T185T, T186T, T331T tienen un perfil similar a <i>Mycoplasma neophronis</i> en la técnica DGGE.		100 % <i>Mycoplasma neophronis</i> .		Antisuero - <i>Mycoplasma neophronis</i> .
	Las cepas T344T, T534T tienen un perfil similar a <i>Mycoplasma gypis</i> en la técnica DGGE.		99% <i>Mycoplasma gypis</i> strain B1/T1NR_024982.1.		

Especie	Muestra	DGGE	Estudio del gen ARNr 16S	Estudio de la región intergénica ISR	Prueba de inhibición del crecimiento GI
<i>Nyctikorax nycticorax</i>	T310T	Perfil similar al aislamiento T311T.	95 % <i>Mycoplasma columborale</i> strain FG298 EU859978.1.		
	T311T	Perfil similar al T310T en la técnica DGGE y con las mismas características bioquímicas.			
<i>Otus scops</i>	T459T	95 % <i>Mycoplasma</i> spp. Sp22 FN394055.1.			
<i>Rissa tridactyla</i>	T396T	95 % <i>Mycoplasma phocicerebrale</i> strain CSL 5195S2 DQ840513.1.			
<i>Streptopelia decaocto</i>	T260T T287T T535T T536T T537T	En la técnica de la DGGE se observan varios perfiles que nos indicó que se trataban de cultivos mixtos que no habían sido bien clonados.			
	T56T	Perfil similar a <i>Mycoplasma columborale</i> en la técnica DGGE y con las mismas características bioquímicas.	Antisuero - <i>Mycoplasma columborale</i> .		
	T403T	Perfil similar a <i>Mycoplasma columbinum</i> en la técnica DGGE y con las mismas características bioquímicas.	Antisuero - <i>Mycoplasma columbinum</i> .		
<i>Tetrao urogallus</i>	T541T	92 % <i>Mycoplasma maculosum</i> strain Skotti B FJ595090.1.			
<i>Tyto alba</i>	T237T T476T T481T	Los perfiles de estas tres cepas son similares en la técnica DGGE.	96 % <i>Mycoplasma iners</i> strain 89R-D-3 FJ666133.1.		

Especie	Muestra	DGGE	Estudio del gen ARNr 16S	Estudio de la región intergénica ISR	Prueba de inhibición del crecimiento GI
<i>Upupa epops</i>	T41T	Perfil diferente al T48T.		86 % <i>Mycoplasma leonicaptivi</i> strain ATCC 49890 AY755603.1.	
	T65T	Perfil similar al T41T.		86 % <i>Mycoplasma leonicaptivi</i> strain ATCC 49890 AY755603.1.	
	T93T	Perfil similar al T41T.		84 % <i>Mycoplasma sp.</i> CSL7529-conjunctiva EU859984.1	
	T258T	Perfil similar a la T41T en la técnica DGGE y con las mismas características bioquímicas.			
	T48T	Perfil diferente al de los otros aislamientos en esta especie		92 % <i>Mycoplasma gallopavonis</i> type strain WR1T. AJ780993.1.	

I.6. DISCUSIÓN

Alejandro Suárez Pérez

I.6.1. Aislamiento de cepas de micoplasmas en las aves silvestres del estudio.

El estudio de las bacterias del Género *Mycoplasma* en aves silvestres ha generado la publicación de muchos trabajos científicos. En la mayoría de estas publicaciones se relaciona la presencia de estas bacterias con procesos patológicos. Destacan los trabajos en los que se analiza el papel como agente primario de los micoplasmas en cuadros clínicos con sinusitis, afecciones del sistema nervioso, muertes embrionarias, perosis y deformidad en la epífisis de los huesos, conjuntivitis y aerosaculitis (Bunts y cols., 1986; Ivanics y cols., 1988; Wobeser, 1997; Erdélyi y cols., 1999; Chin & Goshgarian, 2001; Lierz y cols., 2007a; Bencina y cols., 2003; Frasca y cols., 2005).

También se ha analizado el posible efecto sinérgico entre micoplasmas y microorganismos patógenos como el virus de Influenza A, *Pasteurella multocida*, *Candida albicans*, *Salmonella spp.*, *Chlamydophila psittaci*, *Trichomonas gallinae* o *Mycobacterium avium* en diferentes aves silvestres, sin resultados concluyentes (Roberts, 1964; Chin & Goshgarian, 2001; Höfle y cols., 2002; Gangoso y cols., 2009). Por otro lado, se han aislado micoplasmas en aves silvestres que no mostraron una sintomatología clínica clara (Bencina y cols., 1987a; Bolske, & Morner, 1981; Poveda y cols., 1990b; Astorga y cols., 1994; Lierz y cols., 2000a; 2002).

Es interesante señalar que en los Proyectos de Recuperación del cernícalo primilla (*Falco naumanni*), águila imperial ibérica (*Aquila adalberti*) o el alimoche canario (*Neophron percnopterus majorensis*) se han aislados micoplasmas diferentes a las especies oficialmente reconocidas (Höfle & Blanco, 2001; Lierz y cols., 2008d; Gangoso y cols., 2009).

Esta tesis doctoral supone una aportación más al conocimiento general de los micoplasmas en las aves silvestres al aislar 174 cepas del género *Mycoplasma* a partir de 552 muestras.

Uno de los problemas principales a la hora de aislar estas bacterias en aves silvestres es la dificultad en la toma de muestras por tratarse de animales de vida libre. Además, son pocos los laboratorios especializados en la tipificación de estas bacterias o que dispongan de las técnicas adecuadas para su identificación.

En los estudios realizados hasta el momento se revelan diferencias importantes en el porcentaje de aislamientos según la especie aviar estudiada. En esta tesis, se han aislado micoplasmas en 19 de las 23 especies de aves rapaces y más concretamente se han obtenido 93 aislamientos en las 213 aves rapaces analizadas, lo que supone un 44 % del total.

Estos datos corroboran los resultados obtenidos por Poveda y cols. (1990b; 1994), Panangala y cols. (1993), Morishita y cols. (1997), Oaks y cols. (2004), Lierz y cols. (2000a; 2000b, 2002, 2008c, d), Loria y cols. (2008), Ruder y cols., (2009) y Lecis y cols. (2010) que describieron un alto porcentaje de micoplasmas en esta clase de aves.

Se han aislado 9 micoplasmas en 15 aves muestreadas de las especies buitre leonado (*Gyps fulvus*) y alimoche canario (*Neophron percnopterus majorensis*). Este alto número de aislamientos obtenido en dichas aves necrófagas es un dato muy interesante.

La alta prevalencia de micoplasmas en la especie *Neophron percnopterus majorensis* o alimoche canario coincide con los resultados de Gangoso y cols. (2009) que identificaron, mediante el uso de la PCR, la presencia de micoplasmas en 19 de los 34 pollos de alimoches y en 8 de los 20 alimoches adultos estudiados. En todos los casos esta presencia de micoplasmas estaba asociada a la identificación de otras bacterias patógenas como las clamidias y salmonelas.

En estas aves, endémicas de Canarias, se ha observado un deterioro del sistema inmune que puede estar asociado a intoxicaciones crónicas por plomo o herbicidas. Además, en estos animales se ha detectado la presencia de residuos de antibióticos (principalmente quinolonas) en hígado y riñones (Lemus y cols., 2008). Este deterioro del sistema inmune puede originar el sobrecrecimiento de bacterias patógenas, hongos u organismos que son considerados como bacterias saprofitas y cuya asociación puede producir procesos patológicos o incluso la muerte (Höfle y cols., 2001a; Lemus y cols., 2008).

El alto número de cepas obtenidas en las aves muestreadas en los proyectos de cría del águila imperial ibérica (*Aquila adalberti*) y el águila azor perdicera (*Hiraaetus fasciatus*) en el Centro de Estudio de Rapaces Ibéricas de Toledo (CERI) indican una posible respuesta de las águilas en general ante un estrés crónico que concuerda con la alta prevalencia de aislamientos bacterianos detectada por Höfle y cols. (2001a).

En este sentido, compartimos con Pennycott y cols. (2005) que uno de los motivos de esta alta prevalencia de bacterias en estos proyectos de recuperación podría estar asociada a la alta densidad de aves silvestres durante un periodo prolongado. También se ha relacionado la elevada presencia de micoplasmas en aves rapaces mantenidas en cautividad con la ingesta de otras especies aviares como las codornices japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) o las palomas bravías (*Columba livia*) que forman parte de su dieta (Madden y cols., 1967; Ikoev y cols., 1972; Tiong, 1978).

El 45 % de las muestras negativas en las aves rapaces correspondió a especies de hábitos nocturnos como el búho chico (*Asio otus*), el mochuelo (*Athene noctua*), el búho del cabo (*Bubo capensis*), el autillo (*Otus scops*) o la lechuza común (*Tyto alba*). En dichas aves solo se aislaron 6 micoplasmas en 53 muestras analizadas, resultado que no se ha podido contrastar con otras publicaciones debido a la ausencia de trabajos en esta línea.

Otras aves en las que se detectó un alto número de aislamientos fueron las especies de la gaviota patiamarilla (*Larus michahellis*), la cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*) y el alcaraván común (*Burhinus oedicnemus*). Esto podría ser debido a que todas estas especies han cambiado drásticamente de hábitos alimenticios y de hábitats, y su contacto con los residuos humanos ha ido en aumento. Este hecho lo evidencian trabajos como el de Assunção y cols. (2007) que encontraron diferencias significativas entre poblaciones de pelícanos (*Pelecanus onocrotalus*) que se alimentaban en un vertedero de una granja de porcinos con los que se alimentaban de presas silvestres.

En dicho estudio se investigó la prevalencia de *Mycoplasma spp.*, *Salmonella spp.*, *Chlamydia psittacci*, ILTV, *Herpesvirus*, NDV *Paramixovirus tipo I*, IBV, *Coronavirus* y AIV o *Influenza A*, en el que se observó un mayor porcentaje de aislamientos de estos patógenos en las aves que se alimentaban en el vertedero.

En las especies del estudio como el martín pescador (*Alcedo atthis*), vuelvepiedras (*Arenaria interpres*), avetoro común (*Botaurus stellaris*), petrel de bulwer (*Bulweria bulweri*), correlimos común (*Calidris alpina*), hubara canaria (*Chlamydotis undulata*), chorlitejo patinegro (*Charadrius alexandrinus*), cigüeña negra (*Ciconia nigra*), cuervo (*Corvus corax*), cuco común (*Cuculus canorus*), guacamayo de spix (*Cyanopsitta spixii*), pico picapinos (*Dendrocopos major*), garceta común (*Egretta garcetta*), frailecillo común (*Fratercula arctica*), pinzón azul de Gran Canaria (*Fringilla teydea polatzeki*), pinzón azul de Tenerife (*Fringilla teydea teydea*), fulmar (*Fulmar glaciaris*), gallineta común (*Gallinula chloropus*), abejaruco común (*Merops apiaster*), cotorra de pecho gris (*Myoppsita monachus*), zarapito trinador (*Numenius phaeopus*), martinete común (*Nycticorax nycticorax*), oropéndola (*Oriolus oriolus*), calamón de allen (*Porphyryula alleni*), cotorra de kramer (*Psittacula krameri*), gaviota tridáctila (*Rissa tridactyla*), chocha perdíz (*Scolopax rusticola*), canario (*Serinus canaria*), págalo parásito (*Stercorarius parasiticus*), charrán común (*Sterna hirundo*), charrán patinegro (*Sterna sandvicensis*), tórtola de collar (*Streptopelia decaocto*), estornino pinto (*Sturnus vulgaris*), mirlo común (*Turdus merula*), zorzal común (*Turdus philomelos*), urogallo (*Tetrao urogallus*) y en la abubilla (*Upupa epops*) es difícil valorar la prevalencia de los micoplasmas ya que fueron pocas las aves por especie analizadas.

Sin embargo, se aislaron pocos micoplasmas en relación con el número total de animales muestreados. Este hecho coincide con el trabajo de Whaling (2009), que afirma que entre las causas del bajo aislamiento de micoplasmas en estas aves, en su mayoría migratorias, está el poco contacto que tienen con poblaciones silvestres o aves domesticadas infectadas. Asimismo, esta autora afirma que para aumentar el número de aislamientos habría que actuar sobre poblaciones silvestres que estuvieran más estrechamente relacionadas con pavos, pollos y pinzones domésticos.

El bajo número de aislamientos observados en las aves marinas como la pardela cenicienta (*Calonectris diomedea*), con tan solo un aislamiento en 42 ejemplares analizados, es muy significativo y coincide con los resultados descritos por Candela y cols. (2008) que no identificaron ningún micoplasma en una colonia de paiños europeos (*Hydrobates pelagicus*). Este hecho pueda estar asociado al poco contacto de estas aves con animales de granja, un mejor sistema inmune y un hábitat más amplio.

Es interesante señalar el bajo número de micoplasmas considerados patógenos identificados durante el desarrollo de la tesis. El único micoplasma aislado en este estudio de aves silvestres fue el *Mycoplasma iowae* en un alcaraván común (*Burhinus oedicephalus*) que murió a las pocas horas de ingresar en el centro de recuperación.

Esta escasa presencia de micoplasmas patógenos puede ser debida al poco contacto de la mayoría de las aves silvestres del estudio con granjas de producción intensiva y al hecho de que la mayoría de las muestras fueran tomadas en animales asintomáticos. Esta baja prevalencia de micoplasmas patógenos coincide con las dificultades para aislar y cultivar este tipo de bacterias en aves silvestres, observadas por Ley y cols. (1997), Bradbury (1998), Hartup y cols. (2001) y Pennycott y cols. (2005).

I.6.2. Caracterización de las cepas aisladas.

A pesar del incremento del empleo de las técnicas moleculares, continúan siendo recomendadas para la caracterización de cepas de micoplasmas, tanto su estudio morfológico como su comportamiento frente a las pruebas bioquímicas y enzimáticas (Brown y cols., 2007).

El aislamiento y cultivo de los micoplasmas en medios de cultivo para su posterior identificación siempre ha sido bastante laborioso y los métodos utilizados hasta ahora se han basado principalmente en el uso de técnicas microbiológicas clásicas como el crecimiento en medios selectivos (Poveda, 1998).

El mejor método de cultivo para aislar micoplasmas ha sido debatido durante muchos años, ya que son organismos difíciles de cultivar, y su aislamiento está condicionado por muchos factores como la composición, enriquecimiento del medio y características de la muestra. Asimismo, el aislamiento y cultivo de estas bacterias requieren de cuidados que comienzan con la recogida del material en el tiempo adecuado, el transporte hasta el laboratorio, las condiciones de conservación, preparación de los medios de cultivo, temperatura, modo de incubación y la observación al microscopio óptico de las colonias.

El desarrollo de este trabajo se ajustó, siempre y cuando fue posible, a un protocolo consistente en que el tiempo transcurrido entre la toma de la muestra y su posterior análisis en el laboratorio fuera mínimo. Se considera que este punto es crucial en el éxito del aislamiento, ya que el porcentaje en las muestras aportadas por los proyectos de recuperación de la paloma rabiche (*Columba junoniae*) en la isla de La

Palma, del guacamayo de Spix (*Cyanopsitta spixii*) en Tenerife y del alcaudón chico (*Lanius minor*) en Barcelona fue muy bajo (2 cepas a partir de 27 aves analizadas).

El protocolo que se propone para la identificación de micoplasmas a partir de muestras procedentes de otros centros es la inoculación de las torundas directamente en medios específicos, su incubación durante 12-24 horas a 37°C y su posterior filtrado antes de ser enviadas al laboratorio.

Para el aislamiento de micoplasmas durante el estudio, se utilizaron antibióticos en los medios de cultivo para evitar el sobrecrecimiento bacteriano según las indicaciones de Poveda y cols. (1990a).

Las muestras se tomaron de la tráquea (T), coana (Co) y cloaca (C), aunque la mayoría de los aislamientos se obtuvo a partir de las muestras de vías respiratorias altas. En la cloaca destaca el aislamiento de *Mycoplasma falconis* en un alcaraván común (*Burhinus oedicnemus*). El bajo número de aislamientos a partir de muestras de cloaca puede ser debido a la concomitancia con otras bacterias que dificultan en gran medida el aislamiento de micoplasmas. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Dhondt y cols. (1998), Botes y cols. (2005) y Frasca y cols. (2005) que investigaron la presencia de micoplasmas en aves silvestres.

El aislamiento de un micoplasma desconocido en el cerebro de un cernícalo vulgar (*Falco tinnunculus*) confirma el interés por investigar la presencia de micoplasmas a partir de otro tipo de muestras, como hicieron Erdélyi y cols. (1999). Estos autores aislaron micoplasmas en un halcón sacre (*Falco cherrug*) a partir de muestras de hígado, hueso y cerebro; Lierz y cols. (2008c) aislaron micoplasmas desconocidos o sin identificar a partir de muestras de semen en cinco aves de presa.

En este sentido, se ha utilizado con buenos resultados los medios de cultivo SP4-II (Ramírez y cols. 1997) y PH (Kirchhoff & Rosengarten, 1984) para el transporte y aislamiento de micoplasmas en aves silvestres, aunque hubiera sido interesante disminuir a la mitad el número de horas de incubación antes de filtrar las muestras tomadas en la cloaca y reducir de esta manera la contaminación con otras bacterias.

Como cabía esperar, las colonias observadas en los medios de cultivo sólidos durante el desarrollo de este trabajo mostraron gran variedad de formas y tamaños. Esta variabilidad refuerza la tesis de Poveda y cols. (1994) que afirman que la morfología de los micoplasmas es extremadamente variable y el tamaño de las colonias siempre se reduce cuando existe una alta densidad de bacterias.

El proceso de clonación de micoplasmas garantizó la obtención de cultivos puros, aunque existieron algunas circunstancias que incidieron negativamente en la obtención de los mismos, entre las cuales hay que destacar la posible asociación en la muestra de cepas de similar velocidad de replicación, lo que dificultó en gran medida su separación. En nuestro trabajo se ha podido comprobar que después del procesamiento de 174 aislamientos, 14 de ellos seguían mezclados, lo que nos indica un porcentaje de error del 8,05 %. Seguramente, esto no habría sucedido si se hubiera filtrado previamente cada clonación, debido a que la filtración separa los micoplasmas que están unidos (Tully, 1983).

Debido a la simplicidad metabólica de estas bacterias, es relativamente pequeño el número de técnicas disponibles para detectar sus actividades enzimáticas específicas y sus requerimientos nutricionales. Muchas de las pruebas bioquímicas se han recomendado para la caracterización de nuevas especies (Brown y cols., 2007); pero son la fermentación de la glucosa y la hidrólisis de la arginina las reacciones bioquímicas más importantes en la diferenciación de los micoplasmas (Pettersen y cols., 1996a y b).

Sin embargo, ninguna prueba bioquímica, tanto aislada como colectiva, identifica inequívocamente un aislamiento como una determinada especie. Además, para algunas reacciones bioquímicas, podrían existir variaciones intraespecíficas, lo que disminuye el valor de su aplicación (Poveda & Nicholas, 1998). Aún así, los métodos de identificación bioquímicos y enzimáticos son importantes para la diferenciación básica de familia y género (Poveda & Nicholas, 1998).

En general los micoplasmas que se encuentran muy relacionados dentro de un cluster filogenético tienen el mismo perfil bioquímico; las diferencias bioquímicas son más evidentes cuanto mayor es la distancia filogenética (Weisburg y cols., 1989). Las pruebas bioquímicas realizadas durante este estudio confirmaron esta afirmación, ya que las cepas relacionadas filogenéticamente presentaban el mismo perfil bioquímico.

Por otro lado, el desarrollo de estas técnicas ofreció una primera clasificación de las especies de aves con muchos aislamientos como en el caso de las especies de alcaraván común (*Burhinus oedicnemus*), cernícalo vulgar (*Falco tinnunculus*), gaviota patiamarilla (*Larus michahellis*) y busardo ratonero (*Buteo buteo*).

En este sentido, podemos afirmar que el estudio del perfil bioquímico y enzimático realizado durante el transcurso de esta tesis simplificó la organización del trabajo y la posterior caracterización de las cepas mediante las pruebas de inhibición de crecimiento, SDS PAGE y en la realización de la técnica DGGE.

Asimismo, los resultados frente al test de sensibilidad de digitonina confirmaron la pertenencia de las cepas del estudio al Género *Mycoplasma*.

Siguiendo las indicaciones de Kersters y cols. (1994), se observó que la técnica de electroforesis SDS PAGE sirvió para el agrupamiento de las cepas aisladas en la especie cernícalo vulgar (*Falco tinnunculus*) al obtener tres perfiles de proteínas totales que coincidieron con los grupos observados previamente en las pruebas bioquímicas.

La realización de las pruebas bioquímicas y el SDS PAGE evidenció la presencia de grupos de cepas dentro de las especies aviares con numerosos aislamientos como en la del cernícalo vulgar (*Falco tinnunculus*), pero el uso de la técnica DGGE ofreció una mejor diferenciación de estas bacterias.

La identificación masiva de micoplasmas procedentes de aves silvestres a través de la DGGE ha sido un hecho novedoso y se basó principalmente en las especificaciones de McAuliffe y cols. (2003; 2005), que consiguieron diferenciar 67 especies de micoplasmas, entre las que destacan 27 especies de importancia veterinaria. Estos autores afirman que con esta técnica se pueden identificar micoplasmas a través de muestras clínicas sin que estas sean inoculadas en medios especiales. Asimismo, estos autores, afirman que con el uso de *primers* específicos de microorganismos del género *Mollicutes*, se identifican micoplasmas en muestras clínicas en menos de 24 horas, en comparación con las dos semanas necesarias con técnicas convencionales.

En nuestro caso, se trabajó solamente con ADN extraído de cultivos filtrados. Sin embargo, tras secuenciar la región intergénica (ISR) de cuatro cepas positivas obtenidas en esta técnica, se observó que se trataban de bacterias identificadas como *Actinobacter baumannii* AB307 0294, por lo que se considera esencial la combinación de otras técnicas de diagnóstico para la identificación de micoplasmas además del uso de la DGGE.

La aplicación de esta técnica evidenció en las especies aviares del estudio con mayor número de aislamientos: alcaraván común (*Burhinus oedicephalus*), gaviota patiamarilla (*Larus michahellis*), cernícalo vulgar (*Falco tinnunculus*), busardo ratonero (*Buteo buteo*) y cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*), una serie de grupos bien diferenciados que redujo el número de cepas que se debían secuenciar. En este sentido, el uso de la DGGE puede suponer un avance importante en el estudio de los micoplasmas en aves silvestres, como lo afirman Loria y cols. (2008).

Sin embargo, McAuliffe y cols. (2005) encontraron problemas al comparar ciertos micoplasmas con esta técnica, ya que guardaban el mismo perfil de banda, a pesar de ser especies diferentes. Estos micoplasmas son: *Mycoplasma gateae* con *Mycoplasma phocicerebrale*; *Mycoplasma maculosum* con *Mycoplasma leopharyngis*; *Mycoplasma canis* con *Mycoplasma edwardii* y *Mycoplasma columbinum* con *Mycoplasma columbinasale*.

Estos autores consideran que dichos resultados obedecen a que entre estos micoplasmas no existe una diferencia significativa en la secuencia de la región amplificada del V3 del ADNr 16S (región amplificada por los *primers* de la DGGE). Además, las secuencias completas del gen ARNr 16S y de las regiones intergénicas entre los genes 16S y 23S (ISR) de estos micoplasmas guardan un alto grado de similitud.

En este estudio se percibió que muchos aislamientos que tenían un movimiento de banda similar en la DGGE dentro de una misma especie aviar poseían la misma secuencia de nucleótidos del gen ARNr 16S y/o región intergénica (ISR). Sin embargo, algunas de las cepas aisladas en diferentes aves, cuyo perfil de banda era similar según la técnica de DGEE, poseían secuencias de nucleótidos diferentes aunque en todos los casos guardaban un alto porcentaje de similitud.

El uso de estas técnicas orientativas permitió agrupar estas cepas para posteriormente seleccionar al menos un representante de cada grupo, con el que se llevó a cabo el resto de técnicas identificativas definitivas. Por motivos económicos y de logística, solo se caracterizó el 54,4 % de los aislamientos compatibles con bacterias del género *Mycoplasma* mediante pruebas de inhibición de crecimiento y/o análisis filogenético del gen ARNr 16S y de la región intergénica (ISR).

En este sentido, el 34,4 % de las cepas del trabajo fue estudiado en profundidad y se pudo alcanzar el nivel identificativo de la especie a través de la secuenciación del gen ARNr 16S y/o la prueba de inhibición de crecimiento. En el 18,3 % de las cepas tan solo se pudo obtener una identificación aproximada mediante la secuenciación de la región intergénica (ISR).

El 44,5 % de las cepas restantes fue identificado al observar similitudes de los perfiles proteicos, bioquímicos y/o de DGEE con los de las cepas representativas identificadas mediante las pruebas definitivas.

I.6.2.1. Caracterización de las cepas mediante el análisis serológico (prueba de inhibición de crecimiento) y la secuenciación del gen ARNr 16S.

Las pruebas serológicas componen uno de los tres pilares sobre los que se construye la taxonomía en *Mollicutes*. Históricamente, la serología ha proporcionado un vínculo vital entre la taxonomía en *Mollicutes* y los principios generales de la taxonomía microbiana, basada en la congruencia de los resultados serológicos y los obtenidos por las pruebas de hibridación de ADN-ADN (Brown y cols., 2007).

La prueba de inhibición de crecimiento es, probablemente, la más común en el diagnóstico serológico de micoplasmas (Edward & Fitzgerald, 1954; Clyde, 1964, Black, 1973; Clyde, 1983; Poveda & Nicholas, 1998), aunque presenta algunas desventajas ya que solo es efectiva con los sueros muy potentes y sin diluir. Además esta prueba solo se puede realizar con aislamientos bien adaptados al crecimiento en medios sólidos (Lefèvre y cols., 1987).

Por otro lado, la prueba puede ser tan específica que la inhibición del crecimiento de las cepas heterólogas de la misma especie puede ser pobre o incluso no existir (estos falsos negativos son más frecuentes cuando se usan antisueros monoclonales). Asimismo, pueden observarse resultados falsos negativos con cultivos viejos, que suelen atribuirse a una acumulación de material en el exterior de la membrana, que ocultan los antígenos. A su vez, pueden observarse falsos positivos entre los miembros del grupo *Mycoplasma mycoides* y entre especies del género *Acholeplasma*. A pesar de estas desventajas, la inhibición del crecimiento ha sido siempre considerada una prueba de gran valor diagnóstico (Lefèvre y cols., 1987).

La aplicación de la prueba de inhibición de crecimiento durante el desarrollo de este estudio se vio limitada por el número de antisueros de los que disponía el laboratorio, por lo que solo se realizó en aquellos aislamientos cuyo perfil bioquímico y de hospedador coincidían con alguno de los 17 antisueros disponibles. En otras ocasiones, esta técnica sirvió para confirmar resultados observados tras los análisis de DGGE y/o del estudio del gen ARNr 16S.

De esta manera se identificó como *Mycoplasma falconis* las siguientes cepas: T4C aislada en un alcaraván común (*Burhinus oedicephalus*), T508T aislada en un águila culebrera (*Circaetus gallicus*); T90T, T91T, T109T, T37C, T38T y T115T aisladas en seis cernícalos vulgares (*Falco tinnunculus*) y la cepa T483T aislada en un águila perdicera (*Hiraaetus fasciatus*).

Todos los aislamientos de cernícalo vulgar presentaban el mismo perfil de banda en el gel de DGGE, y al comparar T38T (cepa de referencia dentro de esta especie) con T508T de un águila culebrera y con T483T de un águila perdicera se observó que mostraban un movimiento de banda muy parecido.

Mycoplasma falconis ha sido aislado anteriormente a partir de otras especies de aves rapaces como el halcón sacre (*Falco cherrug*), halcón gerifalte (*Falco rusticolus*) y el cernícalo primilla (*Falco naumanni*) (Poveda y cols., 1994; Lierz y cols., 2002; Lierz y cols., 2008d), pero es la primera vez que se describe en el águila culebrera, cernícalo vulgar y águila perdicera, con lo que se puede afirmar que este micoplasma presenta escasa especificidad por una especie de ave en concreto.

La presencia de este micoplasma en un alcaraván común (*Burhinus oedicephalus*) tiene una gran importancia epidemiológica, pues implica su posible transmisión entre aves rapaces y alcaravanes. Este hecho fue observado anteriormente por Schmidt y cols. (2009) que identificaron este micoplasma en el 38 % de una población silvestre de alcaravanes comunes en los Emiratos Árabes.

También se identificó en otro alcaraván común (*Burhinus oedicephalus*) la cepa T304T como ***Mycoplasma 72 CL*** aislado en un pelícano (*Pelecanus onocrotalus*) en Sudáfrica (Poveda y cols., 2008). En este caso, se utilizó la inhibición del crecimiento para corroborar los resultados observados tras secuenciar el gen ARNr 16S de esta cepa.

Se requieren más estudios para profundizar en la epidemiología de este tipo de micoplasmas desconocidos que han sido aislados a partir de hospedadores tan diferentes y en lugares tan lejanos.

Igualmente, a través de esta técnica se identificó en otro alcaraván común (*Burhinus oedicephalus*) la cepa T4T como ***Mycoplasma iowae***. Esta bacteria posee propiedades diferentes a las de otros micoplasmas aviares y las cepas que pertenecen a esta especie tienen un grado elevado y poco común de variación antigénica (Bradbury & Kleven, 2008).

Asimismo, esta bacteria ha sido identificada en muchas aves silvestres: mirlo común (*Stumus vulgaris*), cormorán (*Phalacrocorax carbo*), garza real (*Ardea cinerea*) y paloma torcaz (*Columba palumbus*) (Rahman y cols., 1996). Amin (1977), Bozeman y cols. (1984) aislaron este micoplasma en un eider común (*Somataria mollissima*) y en un loro real amazónico (*Amazona ochrocephala auropalliata*). En todos los casos se detectó la presencia de este micoplasma asociado a procesos clínicos en el sistema respiratorio.

La presencia de estos micoplasmas (*M. falconis* y *M. iowae*) en los alcaravanes comunes puede ser debido a su estrecho contacto con los seres humanos y deben ser considerados portadores potenciales de micoplasmas patógenos entre diferentes lotes avícolas.

Por otro lado, se consiguió identificar como ***Mycoplasma columbinum*** la cepa T249T aislada en un gavián (*Accipiter nissus*), T149SC y T297O aisladas en dos palomas turqué (*Columba bollii*), T156T aislada en una paloma rabiche (*Columba junoniae*), T389T aislada en una gaviota patiamarilla (*Larus michahellis*) y la cepa T403T aislada en una tórtola turca (*Streptopelia decaocto*).

Incluso, se identificó como ***Mycoplasma columborale*** la cepa T124T aislada en una paloma rabiche (*Columba junoniae*) y la cepa T56T aislada en una tórtola turca (*Streptopelia decaocto*).

M. columbinum y *M. columborale* fueron descritos por primera vez por Shimizu y cols. (1978) y desde entonces han sido identificados, en la mayoría de las ocasiones, en palomas bravías (*Columba livia*) y su presencia siempre ha estado asociada a trastornos respiratorios y lesiones oculares (MacOwan y cols., 1981; Esposito, 2000; Loria y cols., 2005).

El aislamiento de estos micoplasmas en la tórtola turca (*Streptopelia decaocto*) y en la gaviota patiamarilla (*Larus michahellis*) supone una nueva perspectiva en la epidemiología de estas bacterias. Por otro lado, el aislamiento de *M. columbinum* en el tracto respiratorio de un gavián (*Accipiter nissus*) confirma los resultados observados por Poveda y cols. (1990a), que describen la posible transmisión de estos micoplasmas en las aves de presa por la ingesta de palomas.

Asimismo, el aislamiento de estos micoplasmas de paloma rabiche y paloma turqué es un hecho interesante, ya que se trata de especies endémicas de Canarias que están catalogadas como vulnerables en el Catálogo de Especies Amenazadas de Canarias, y cualquier información que se aporte sobre ellas puede resultar de gran valor para su conservación.

Al disponer de pocos antisueros con los que comparar las cepas obtenidas durante el estudio y prever que la mayoría de los aislamientos fueran micoplasmas desconocidos o sin identificar, se procedió a la secuenciación del gen ARNr 16S de las cepas representativas, seleccionadas tras las pruebas orientativas y/o en los análisis serológicos.

La secuenciación del gen ARNr 16S está considerada como una herramienta taxonómica fiable y ha demostrado ser un instrumento valioso en multitud de estudios filogenéticos, entre los que se encuentran los llevados a cabo con las especies del género *Mollicutes* (Brown y cols., 2007).

En este sentido, y siguiendo las indicaciones del *International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes*, las siguientes cepas podrían ser consideradas como especies nuevas, ya que el porcentaje de similitud del estudio del gen ARNr 16S es bajo ($\leq 96\%$) y sobre todo porque han sido aisladas a partir de hospedadores sobre los que nunca antes se había investigado. Estas cepas son: T398T aislada en un frailecillo común (*Fratercula artica*); T129T aislada en un fulmar (*Fulmar glaciaris*); T350T, T66T, T391T, T402T, T50T, T364T, T121T, T451T y T350T aisladas en nueve gaviotas patiamaila (*Larus michahellis*); T125T aislada en un alcatraz común (*Morus bassanus*); T311T y T310T aisladas en dos martinetes comunes (*Nycticorax nycticorax*); T459T aislada en un autillo europeo (*Otus scops*), T396T aislada

en una gaviota tridáctila (*Rissa tridactyla*) y las cepas T237T, T476T, T481T aisladas en tres lechuzas comunes (*Tyto alba*).

En otros casos, tras la secuenciación del gen ARNr 16S, se observó la presencia de algunas cepas que guardaban un alto porcentaje de similitud con micoplasmas identificados anteriormente en otras aves silvestres.

En primer lugar destacamos la presencia de cinco cepas con un alto porcentaje de similitud con *Mycoplasma gypis*. Estas cepas son: T138T aislada en un alcaraván común (*Burhinus oedicephalus*); T58T y T106T aisladas en dos busardos ratoneros (*Buteo buteo*) y las cepas T344T, T534T aisladas en dos alimoches canarios (*Neophron percnopterus majorensis*).

Todas estas cepas mostraron el mismo perfil en el gel de DGGE y eran muy parecidas a los perfiles de DGGE de las cepas T110T, T59T, T77T, T166T, T362T, T161T, T87T, T83T, T523T, T526T, T94T, T155T aisladas en alcaravanes comunes, a los perfiles de DGGE de las cepas T89T, T183T, T81T aisladas en tres busardos ratoneros, a los perfiles de banda de las cepas T485T y T475T aisladas en dos águilas imperiales y a los perfiles de las cepas T517T y T491T aisladas en dos águilas reales.

En este sentido, se considera que estas 19 cepas están muy relacionadas con *M. gypis* ya que poseen las mismas características bioquímicas, un movimiento similar de banda en el gel de DGGE y un porcentaje de similitud de la región intergénica (ISR) muy alto ($\geq 98\%$). No obstante, para la identificación final de estas cepas se requerirían pruebas moleculares adicionales.

M. gypis fue aislado por primera vez en un buitre leonado (*Gyps fulvus*) con problemas respiratorios por Poveda y cols. (1994) y desde su descubrimiento ha sido aislado en diferentes especies de aves silvestres. El trabajo de Schimidt y cols. (2009) describe la presencia de dicho micoplasma en el 38 % de una muestra de alcaravanes comunes (*Burhinus oedicephalus*) en los que también se detectó el *M. falconis*.

En segundo lugar, se observó que la cepa T12T, aislada en un búho chico (*Asio otus*) y las cepas T88Ce, T88T, T72T, T95T, T200T aisladas en cuatros cernícalos vulgares (*Falco tinnunculus*) guardaban una alto porcentaje de similitud (99%) con ***Mycoplasma sp. M200-2 clone 2*** aislado en un cernícalo primilla (*Falco naumanni*) por Lierz y cols. (2008d). A su vez, todas estas cepas mostraron un movimiento de banda muy similar en el gel de DGGE y además eran iguales a los perfiles de las cepas T455T y T458T aislados en dos cernícalos primillas (*Falco naumanni*) y a los perfiles de T463T, T63T, T42T, T69T, T76T, T73T, T55T, T74T, T150T, T173T, T262T, T120T, T182T, T194T, T201T, T108T, T129T, T84T, T99T, T461T, T472T aislados en 21 cernícalos vulgares (*Falco tinnunculus*). A parte de estas similitudes según la técnica de DGGE, se observó que las regiones intergénicas (ISR) de las cepas T455T y T458T aisladas de dos cernícalos primillas eran exactamente igual a las cepas representativas aisladas de los cernícalos vulgares.

En tercer lugar, se observó que las cepas T159T y T101T aisladas en dos cernícalos vulgares (*Falco tinnunculus*) tenían una secuencia de nucleótidos muy similar al ***Mycoplasma sp. M222-5 clone 1*** aislado en otro cernícalo primilla (*Falco naumanni*) por Lierz y cols. (2008d). Todas estas cepas tenían el mismo perfil en el gel de DGGE y, a su vez, eran iguales a los perfiles de DGGE de las cepas T236T, T316T, T462T, T359T, T219T, T169T aisladas en la misma especie de cernícalo.

Estos micoplasmas (*M. spp. M200-2* clone 2 y *M. spp. M221-5* clone 1) fueron identificados en el Proyecto de Cría en Cautividad del Cernícalo primilla (*Falco naumanni*) en el sur de España, y al igual que en nuestro trabajo, se observó que eran muy similares entre sí y a su vez muy parecidas a otra cepa aislada anteriormente por los mismos autores en un halcón en Alemania.

La elevada prevalencia de estos micoplasmas aporta nuevos datos a la epidemiología bacteriana de las aves rapaces, lo que hace muy interesante el estudio de su posible papel patógeno.

En cuarto lugar, existe un conjunto de cepas que guardan una estrecha relación con los siguiente micoplasmas: ***Mycoplasma Sgv 1*** aislado por Lecis y cols. (2010a) en un buitre leonado (*Gyps fulvus*), ***Mycoplasma spp. SF9*** aislado en el semen de un águila real (*Aquila crysaetus*) por Lierz y cols. (2008c) y con el ***Mycoplasma spp. 1449*** aislado por Höfle y cols. (2002) en un águila imperial ibérica (*Aquila adalberti*).

Las cepas de nuestro estudio, parecidas al grupo de micoplasmas descritos con anterioridad fueron: T136T aislada en una garza real (*Ardea cinerea*); T6T aislada en un busardo ratonero (*Buteo buteo*); T187T aislada en un halcón tagarote (*Falco peregrinoides*) y T196T aislada en un milano negro (*Milvus migrans*).

Todas estas cepas tenían un perfil de DGGE similar al *Mycoplasma spp. 1449* (este micoplasma fue cedido a nuestro laboratorio por los investigadores que lo identificaron) y su vez eran iguales a los perfiles de DGGE de la cepa T533T aislada en un gavián común (*Accipiter nissus*); T326T aislada en un busardo ratonero (*Buteo buteo*); T193T aislada en un alimoche encapuchado (*Neophron monachus*) y la cepa T513CO aislada en un buitre leonado.

Es importante destacar que el árbol filogenético resultante de los análisis de la secuencias intergénicas (ISR) de todas estas cepas confirmó que todos los aislamientos estaban muy relacionados entre sí ($\geq 97\%$), lo que demuestra la hipótesis de Lierz & Hafez (2008a,d), que manifestaron con anterioridad la estrecha relación de parentesco entre los micoplasmas aislados por ellos mismos.

Dicho esto, haría falta estudiar más profundamente las relaciones filogenéticas de todos estos micoplasmas e investigar su posible papel como patógeno primario o secundario en los procesos clínicos que afectan a las aves rapaces silvestres y domesticadas.

Otra clase de aves en las que se observó la presencia de muchos micoplasmas diferentes fueron las gaviotas patiamarillas (*Larus michahellis*). Destaca en primer lugar, que las cepas T264T, T158T, T363T guardan un alto porcentaje de similitud en el gen ARNr 16S (99%) con los de *M. gallisepticum* y *Mycoplasma spp. 27635*, este último aislado en una gaviota dominicana (*Larus dominicanus vetula*) en Sudáfrica por Poveda y cols. (2008). Por otro lado, el estudio de la región intergénica de la cepa T230T aislada en una pardela cenicienta (*Calonectris diomedea*) confirmó que guardaban un 100 % de similitud con la cepa T264T aislada en una gaviota patiamarilla.

Todas estas cepas se encuentran muy relacionadas filogenéticamente con *M. gallisepticum* pero sería necesaria la realización de otros análisis moleculares para demostrar esta hipótesis.

En esta misma especie de gaviota, se observó que la cepa T98T (cepa representativa del grupo) tenía un porcentaje de similitud del 100 % con el ***Mycoplasma* spp. 27639**, aislado por Poveda *et al.* (2008) en doce gaviotas dominicanas (*Larus dominicanus vetula*); al realizar la DGGE se observó que las cepas T256T, T356T, T240T, T355T, T247T, T195T, T400T, T275T, T179T, T177T, T261T, T349T, T278T, T244T, T283T, T356T aisladas en otras dieciséis gaviotas patiamarillas (*Larus michahellis*) tenían el mismo perfil que la cepa T98T y que el *Mycoplasma* spp. 27639.

Por último se observó que las cepas T346T y T265T aisladas en dos especies de gaviotas diferentes (*Larus michahellis* y *Larus ridibundus*) tenían un 99 % de similitud con el ***Mycoplasma* spp. 38104**, aislado en tres gaviotas dominicanas (*Larus dominicanus vetula*) por Poveda y cols. (2008).

1.6.2.2. Caracterización de las cepas tras la secuenciación de la región intergénica (ISR) y su análisis filogenético.

La región intergénica (ISR) ha sido el objeto de diversas PCRs para la detección de micoplasmas, como la PCR descrita por Harasawa y cols. (1993) para diagnosticar contaminaciones de micoplasmas en cultivos celulares o la PCR para detectar *M. pulmonis* en aislamientos clínicos de ratas infectadas (Takahashi-Omoe y cols., 2004) o para el diagnóstico de *M. felis* (Chalker y cols., 2004) o para la identificación de fitoplasmas en plantas infectadas (Smart y cols., 1996).

Sin embargo, son pocos los trabajos en los que se utiliza dicho gen para el estudio de las relaciones filogenéticas entre micoplasmas. En un estudio realizado por Ramírez y cols., (2008) se observa que la secuenciación de la región intergénica (ISR) de los 23 micoplasmas aviáres descritos hasta el momento denota que la mayoría de ellos produce bandas de PCR entre los 400 y 600 pb, y son excepcionales las bandas del *M. gallisepticum* (1000 pb) y del *M. imitans* (3000 pb), lo que confirma las observaciones de Harasawa y cols. (2004).

Los resultados observados por Ramírez y cols. (2008) indican que la información codificada en la ISR parece ser útil para diferenciar las especies de micoplasmas aviáres, aunque la variabilidad de la ISR en cepas de campo dentro de una misma especie de *Mycoplasma* no está todavía bien documentada. Asimismo, estos autores encuentran únicamente una homología completa con los serotipos y las cepas de campo del *M. iowae*, y es el *M. gallisepticum* el que presenta mayor variabilidad entre sus cepas (94%), mientras que el *M. synoviae* y *M. meleagridis* presentan una homología del 96,1 % y del 97,2 %, respectivamente.

A pesar de esto, la información codificada en la ISR parece ser de utilidad para diferenciar las especies de los micoplasmas aviáres, porque el máximo porcentaje de homología entre las especies estudiadas fue del 90,5 % y el mínimo del 7,9 %, por lo que el valor medio es del 50,1 %, mientras que los resultados equivalentes obtenidos a partir del gen ARNr 16S fueron del 99,8 % - 74,2%, con una media del 86,5% (Ramírez y cols., 2008).

Harasawa (1999) afirma que al utilizar la ISR como marcador filogenético y comparar los resultados con los datos obtenidos a partir del gen ARNr 16S, se observa que el árbol filogenético derivado de la ISR no es idéntico al obtenido a partir del gen ARNr 16S.

Los resultados de Ramírez y cols. (2008) muestran que los porcentajes de homología entre las ISR son menores que en el caso del gen ARNr 16S. En este sentido, la gran variabilidad en las secuencias y la gran longitud de las ISR hacen difícil establecer relaciones filogenéticas, lo que reduce el valor de este tipo de análisis de las secuencias de la ISR para la identificación de organismos desconocidos (Yoon y cols., 1997), sin embargo, estas mismas características los convierte en buenos marcadores para la clasificación bacteriana (Pérez-Luz y cols., 1998).

En esta Tesis Doctoral se ha trabajado en la mayoría de las ocasiones con hospedadores y cepas de campo novedosos; la utilización del gen ISR supuso un primer paso en la caracterización de estos micoplasmas, que además redujo los costes que hubieran supuesto el secuenciado del gen ARNr 16S de todos los micoplasmas.

Sin embargo, y compartiendo las afirmaciones de Harasawa y cols. (2000) y Ramírez y cols. (2008), la (ISR) puede ser más útil en la comparación de especies y

subespecies estrechamente relacionadas, mientras que el gen ARNr 16S es más útil como cronómetro en análisis filogenético.

No obstante, las cepas que se detallan a continuación podrían considerarse especies nuevas de micoplasmas, ya que el porcentaje de similitud de las (ISR) es muy bajo (menor del 94%) si lo comparamos con las depositadas en el “GenBank Database”; se recomienda un estudio más profundo mediante la secuenciación del gen ARNr 16S y otras pruebas, como dictan las normas de “International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the taxonomy of Mollicutes”.

Estas cepas son: T533C aislada en un gavián común (*Accipiter nissus*); T479T y T473T en dos águilas imperiales (*Aquila adalberti*); T496T, T500T y T501T en tres mochuelos europeos (*Athene noctua*); T233T₂ y T128T aisladas en dos busardos ratoneros (*Buteo buteo*), T454T, T452T, T460T, T465T, T453CO Y T511T aisladas en seis cigüeñas blancas (*Ciconia ciconia*); T495 CO aislada en una cigüeña negra (*Ciconia nigra*); T457CO aislada en un águila culebrera (*Circaetus gallicus*); T164T aislada en una gaviota patiamarilla (*Larus michahellis*), T469T aislada en un aguilucho lagunero (*Circus aeruginosus*); T286T aislada en un halcón tagarote (*Falco pelegrinoides*); T549T aislada en un quebrantahuesos (*Gypaetus barbatus*); T270T aislado en una gaviota reidora (*Larus ridibundus*); T550T aislada en un águila azor-perdicera (*Hieraaetus fasciatus*); T541T aislada en un urogallo (*Tetrao urugallus*) y las cepas T41T, T65T, T93T, T258T Y T48T aisladas en cinco abubillas (*Upupa epops*).

Asimismo, se observó que las cepas T479T aislada en un águila imperial (*Aquila adalberti*) y T457CO aislada en un águila culebrera (*Circaetus gallicus*) mostraron la misma (ISR) y el mismo perfil en la DGGE, y se consideran cepas muy relacionadas filogenéticamente que posiblemente sean micoplasmas no descritos hasta el momento.

Por último, se encontró una estrecha relación entre las cepas T329T, T233T₂ y T128T aisladas en tres busardos ratoneros (*Buteo buteo*) ya que mostraron la misma (ISR) y el mismo perfil en la DGGE.

Alejandro Suárez Pérez

I.7. ANEXO

Alejandro Suárez Pérez

Medios de aislamiento.

Los medios de cultivo utilizados para la realización de este estudio fueron el SP4-II (Ramírez y cols., 1997) y el PH (Kirchhoff & Rosengarten, 1984). La composición y el modo de preparación fue el siguiente:

Medio SP4-II	
Fase A	
Bacto PPLO broth	4,2 g
Bacto peptona	6,4 g
Bacto tryptona	12,0 g
Agua destilada	535,0 ml
Se ajustó el pH a 7,8 y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos.	
Para el medio sólido se incluyeron en esta fase, 7,0 g de agarosa.	
Fase B	
Extracto fresco de levadura (25% p/v) (1)	42,0 ml
Solución de ampicilina (100 mg/ml)	2,5 ml
Solución de extracto de levadura (5g/250ml)	120,0 ml
Solución de DNA (0,4% p/v)	5,5 ml
Piruvato sódico	2,5 ml
B-NAD	0,125 g
L-cisteína hidroclorehídrica	0,125 g
CMRL 1066 (10X)	60,0 ml
Solución de rojo fenol (0,1%)	24,0 ml
Agua bidestilada	207,5 ml
Se ajustó a pH: 7,2. Se prefiltró a través de papel de filtro y se filtró por membrana Millipore de 0,22 micrómetros.	
Fase C	
Suero de caballo estéril inactivado (2)	251,0 ml
Asépticamente se agregó a la fase A, las fases B y C. El medio líquido se distribuyó en tubos estériles de 5 ml, a razón de 2 ml/tubo y se guardaron a -20°C hasta su uso. En el caso de medio sólido, antes de mezclar las tres fases se atemperaron a 45°C, para distribuirse inmediatamente después de mezclarse en placas de Petri estériles de 15 mm de diámetro, las cuales se conservaron a 4°C.	

Medio PH	
Fase A	
Bacto PPLO broth	16,80 g
Agua destilada	700 ml
Se ajustó el pH a 7,4 y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 30 minutos.	
Para el medio sólido se incluyeron en esta fase 28 g de Bacto PPLO agar, en vez de Bacto PPLO Broth.	
Fase B	
Extracto fresco de levadura (25% p/v) (1)	18 ml
Solución de penicilina G (100.000 UI/ml)	6 ml
Solución de DNA (0,4% p/v)	4,40 ml
B-NAD	0,10 g
L-cisteína hidrociorhídrica	0,10 g
Agua bidestilada	91 ml
Se ajustó a pH: 7,4 y se filtró por membrana Millipore de 0,22 micrómetros.	
Fase C	
Suero de caballo estéril inactivado (2)	178 ml
Asépticamente se agregó a la fase A, las fases B y C. El medio líquido se distribuyó en tubos estériles de 5 ml, a razón de 2 ml/tubo y se guardó a -20°C hasta su uso. En el caso de medio sólido, antes de mezclar las tres fases se atemperaron a 45°C, para distribuirse inmediatamente después de mezclarse en placas de Petri estériles de 15 mm de diámetro, las cuales se conservaron a 4°C.	

(1). Preparación del extracto de levadura al 25 % p/v: *{Saccharomyces cerevisiae}*: En un baño atemperado a 45°C se calentaron 500 ml de agua bidestilada. Se añadieron 500 g de levadura de panadería fresca en pequeños fragmentos y se aumentó la temperatura del baño a 80°C durante 90 minutos. Se retiró la solución del baño y se depositó en agua fría durante aproximadamente 15 minutos. Transcurrido este tiempo, y con ácido clorhídrico concentrado se ajustó el pH a 4,5. Se mantuvo la suspensión a la misma temperatura durante 30 minutos más. Se centrifugó dicha suspensión a 3.000 g durante 30 minutos, se recogió el sobrenadante y se añadió el mismo volumen de agua bidestilada.

Por último, se filtró por filtros de diámetro de poro de 0,22 μm en condiciones estériles. El extracto de levadura puede conservarse 6 meses en congelación a -20°C .

(2). Inactivación del suero de caballo: Se calentó el suero de caballo (descongelado) en un baño de temperatura a 56°C durante 30 minutos y se conservó el suero descomplementado a -20°C .

Medios para la identificación bioquímica de micoplasmas.

Todos los componentes de los medios para determinar la bioquímica de las diferentes cepas se esterilizaron antes de mezclarse y se conservaron a -20°C . La solución de HIB (Heart infusion broth) y la de HIA (Heart infusion agar) se esterilizaron en autoclave y el resto por filtración (0,20 μm), a excepción del suero de caballo que se comercializa ya estéril. Una vez realizada la mezcla, se ajustó al pH adecuado y se esterilizó por filtración (0,20 μm). Los medios líquidos fueron distribuidos en tubos de plástico estériles a razón de 2 ml por tubo y se congelaron hasta su uso.

Medio líquido estándar (20% de suero)	
Solución de HIB (2,5% p/v)	296 ml
Solución de DNA (0,2% p/v)	4 ml
Suero de caballo inactivado	80 ml
Solución extracto de levadura (10%p/v)	20 ml
pH final: 7,6	

Medio para la prueba del tetrazolium	
Solución de HIB (2,5% p/v)	146 ml
Solución de ADN (0,2% p/v)	2 ml
Suero de caballo inactivado	40 ml
Solución de extracto de levadura (10% p/v)	10 ml
Solución 2,3,5-trifeniltetrazolium (2% p/v)	20 ml
pH final: 7,6	

Medio para la prueba de la hidrólisis de la urea

Solución de HIB (2,5% p/v)	146 ml
Solución de ADN (0,2% p/v)	2 ml
Suero de caballo inactivado	20 ml
Solución extracto de levadura (10% p/v)	10 ml
Solución de urea (10% p/v)	20 ml
Solución de rojo fenol (0,5% p/v)	2 ml
pH final: 7,0	

Medio para la prueba de la hidrólisis de la arginina

Solución de HIB (2,5% p/v)	146 ml
Solución de ADN (0,2% p/v)	2 ml
Suero de caballo inactivado	20 ml
Solución extracto de levadura (10% p/v)	10 ml
Solución de arginina (10% p/v)	20 ml
Solución de rojo fenol (0,5% p/v)	2 ml
pH final: 7,0	

Medio para la prueba de la fermentación de la glucosa

Solución de HIB (2,5% p/v)	146 ml
Solución de ADN (0,2% p/v)	2 ml
Suero de caballo inactivado	20 ml
Solución extracto de levadura (10% p/v)	10 ml
Solución de glucosa (10% p/v)	20 ml
Solución de rojo fenol (0,5% p/v)	2 ml
pH final: 7,6	

Medio para la prueba de la fermentación de la manosa

Solución de HIB (2,5% p/v)	146 ml
Solución de ADN (0,2% p/v)	2 ml
Suero de caballo inactivado	20 ml
Solución extracto de levadura (10% p/v)	10 ml
Solución de manosa (10% p/v)	20 ml
Solución de rojo fenol (0,5% p/v)	2 ml
pH final: 7,6	

Solución protectora para la liofilización.

Para la preparación de la solución protectora de liofilización se disolvieron 6,67 g de myo-Inositol en 33,3 ml de agua destilada. Se filtró por una membrana “Millipore” de 0,22 micrómetros y por último se añadió 100 ml de suero de caballo inactivado.

Reactivos para el SDS-PAGE.

	Resolving gel (10%)	Stacking gel (4%)
Acrilamida (*)	13,2 ml	2,25 ml
Agua bidestilada	16 ml	2 ml
1.5M Tris-HCL pH 8,8 (Buffer Low)	10 ml	
0.5M Tris-HCL pH 6,8 (Buffer up)		3,75 ml
10% SDS	400 µl	150 µl
10% APS	150 µl	50 µl
TEMED	50 µl	30 µl

(*) 30% Acrylamide/Bis Solution, 37.5:1 (2.6%) de BIO-RAD.

Modo de preparación de los reactivos:

Dodecil Sulfato de Sodio: para la elaboración del SDS al 10 % se pesaron 10 g de SDS en 100 ml de agua destilada.

Amonium persulfato: La solución de APS se preparó siempre al realizar el gel.

Tampón de carga: para la elaboración del tampón de carga se prepararon dos soluciones diferentes:

Mezcla A (Volumen total 12,4 ml):

- 2,5 ml de Buffer Up
- 4 ml de SDS al 10%
- 2 ml de Glicerol
- 1,5 ml de agua destilada + 20% de β -mercaptoetanol (2,4 ml)

Mezcla B o Azul de Bromofenol:

- Pesar 0,04 g de azul de Bromofenol y disolver en 10 ml de agua destilada completamente.

A la mezcla A se añadieron 200 μ l de la solución de azul de Bromofenol y se disolvió bien.

Reactivos de la Técnica de Lowry.

Solución A (para 100 ml):

- 1% de tartrato sódico (1g / 100ml)
- Una vez disuelto se le añadió 100 mg de sulfato cúprico.

Solución B (para 100 ml):

- 10% de carbonato sódico, Na_2CO_3 (10g / 100 ml)
- Añadimos hidróxido sódico (NaOH) 0,5M (2g / 100 ml)

- Se desecharon 10 ml de la solución B y se sustituyeron por 10 ml de la solución A. Posteriormente se prepararon las diluciones para el patrón con dos cubetas de cada concentración y se utilizó un total de 12 cubetas para el patrón.

El patrón utilizado para esta técnica fue Albúmina Bovina = Bs A:

[]	Bs A	H ₂ O
200	500 µl	0 µl
150	375 µl	125 µl
100	250 µl	250 µl
50	125 µl	375 µl
25	63 µl	438 µl
0	0 µl	500 µl

Luego se prepararon las muestras y se realizaron dos diluciones por cada muestra.

- *Dilución al 1/10:* 450 µl de H₂O destilada y 50 µl de muestra.
- *Dilución al 1/20:* 475 µl de H₂O destilada y 25 µl de muestra.

Tanto al patrón como a las muestras se le añadieron 500 µl de la solución A + B preparada y se obtuvo un volumen final de 1000 µl = 1 ml. Se agitaron todas las cubetas y se dejaron reposar 10 minutos. Mientras, se preparó el reactivo de Folin Ciacultau con una dilución al 1/10 y se añadió 1,5 ml a cada cubeta del reactivo preparado. Se agitó y y después de 30 minutos se tomó la lectura por medio del espectrofotómetro.

Reactivos de la Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización (DGGE).

Solución de acrilamida al 60% de urea: **“High” (H)**:

- Se mezclaron 126 g de urea con agua estéril hasta obtener una solución con un volumen de 200 ml.
- Se añadieron 125 ml de acrilamida al 30% a la solución anterior más 120 ml de formamida desionizada y 10 ml de buffer 50 x TAE .
- Se rellenó una cubeta con agua estéril hasta alcanzar un volumen de 500 ml.
- Se mezclaron suavemente ambas soluciones.

Solución de acrilamida al 30% de urea: **“Low” (L)**:

- Se mezclaron 63,1 g de urea con agua estéril hasta obtener una solución con un volumen de 200 ml.
- Se añadieron 125ml de acrilamida al 30 % a la solución anterior más 60 ml de formamida desionizada y 10 ml de buffer 50 x TAE.
- Se rellenó una cubeta con agua estéril hasta alcanzar un volumen de 500 ml.
- Se mezclaron suavemente ambas soluciones.

Reactivos para la extracción de ADN

Solución de Lisis:

Se disolvieron 120 g de Tiocianato de Guanidina en 100 ml de 0,1M de Tris-HCl pH 6,4. Seguidamente se añadieron 22 ml de EDTA 0.2M pH 8,0 y 2,6 g de Tritón X - 100.

Solución de Lavado:

Se disolvieron 120 g de tiocianato de guanidina en 100 m de Tris-HCl pH 6,4.

Solución desnaturalizante (0.5M NaOH, 1.5M NaCl):

Se disolvieron 2 g de NaOH (30g/500ml H₂O) y 8,8 g de cloruro sódico en 100 ml de agua destilada.

Sílica

Se disolvieron 60 g de sílica en 500 ml de agua destilada. Se dejó decantar al menos 24 horas para posteriormente eliminar el sobrenadante. Se añadió el mismo volumen de agua destilada, se mezcló bien y se decantó durante otras 5 horas. Se eliminó parte del sobrenadante y se ajustó el pH a 2,0 con HCl concentrado. Por último, se distribuyó en alícuotas y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Solución TAE 50X:

Se disolvieron 24,2 g de Tris en 5,71 ml de ácido acético glacial y 10 ml de 0,5 M EDTA pH 8,0.

Solución TE pH: 8,0

Se colocó en un matraz aforado 200 μ l de EDTA 50X y 1 ml de TRIS-HCL 1M pH 8,0. Se ajustó el volumen a 100 ml con agua bidestilada y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

I.8. ANEXO

Alejandro Suárez Pérez

Secuencia de nucleótidos de las cepas del estudio:

Especie	Cepa	Secuencia de nucleótidos	Homología
Accipiter nissus	T533T	Región intergénica (ISR) TTGTACACACCCCGTCACACCATGGGAGCTGGTAATGCCGAAGTCGGTTTAGT CAACTACGGAGACAACCTGCCTAAGGCAGGACTGGTACTGGGGTGAAGTCGTAA CAAGGTATCCCTACGAGAAGCTGGGGATGGATTACCTCCTTCTACGGAGTACAC ATAAACAAATATTTATTGTTACTTAATACCTTATTTATAAAATATTTCTCATGGGA TATATCTAGTTTTGAGAGGATTTCTCTCTATGTTCTTTGAAAACCTGAATAGTAAAG ATATTAATATAACACGACATCAAAAAATAAATAGTCAATTTGTTTGTGATACCG AGAAATATTAGAAATAAATAATCGTTAAAAATGTCTTTGAAATACATCAACAACAAT AGGAAAATATTGTACAACCTTTAAATAAGTAAGAGTTTGTGGTGGATGCCTTGGG TCTGAAAGTCGATGAAGGACG	97 % <i>Mycoplasma sp. 1449</i>. FM196533.1 95 % <i>Mycoplasma sp. Sgv1a</i> GQ150562.1 94 % <i>Mycoplasma verecundum</i> AY781781.1 88 % <i>Mycoplasma cynos strain H- 831 DQ847425.1</i>
		Gen ARN Ribosómico 16 S GTCGGTTTTGTTACTACGGAGACAACCTGCTAAGGCAGGACTGGTACTGGGGTGAAGTCGTAACA AGGTATCCCTACGAGAACGTGGGGATGGATTACCTCCTTCTACGGAGTACAACGACTTACTATAT ATAAGTCATCTTATTACCGACTATTTTTATTCAAAATTTGATTAATAATTTGTTACTACTATGTTAAT AGTCCATAGATATATCTAGTTTTGAGAGAACCTTCTCTCATTGTTCTTTGAAAACCTGAATAGTAAAGA TATTAACAGGACATCAAAATAAATAAATTTGGTTAATTTGTTGTTGATTGATACCCGAGTAAATTA CAATGTAATAATTTTAAATGCTTTGAAATATACATCAACAATAGGTTATATACTAAATTAACCTTTT AAATAAGTAAGAGTTTGTGGTTTTGTTACTACGGAGACAACCTGCTAAGGCAGGACTGGTACTG GGTGAAAGTCGTAACAAGGATCCCTACGAGAACCTGGGGATGGATTACCTCTTCTACGAGATA CAACGACTTACTATAAATAAGTCACTTATTACCGACTATTTTTATTCAAAATTTGATTAATTAAT GTTATGACTATGTTAATGCTCCTAGATATATCTAGTTTGGAGAGAACTTCTCTCATTGTTCTTTGA AACTGAATAGTAAGATATTAACAACGACATCAAAATAAATAAATTTGTTAATTTGTTGTTGATT GATACCGAGTAAATTAACAATGTAATAATTTAATGAAATGCTTTGAAATACATCAACAATAGGTT TATACTTAAATTAACCTTTAAATAAGTAAGGTTT	92 % <i>Mycoplasma buteonis strain Bb/T2g DQ847424.1</i> 89 % <i>Mycoplasma gallopavonis strain WR1 FJ226577.1</i> 87 % <i>Mycoplasma glycyphilum AY729932.1</i> 85 % <i>Mycoplasma corogypsi AY780796.1</i>
	T249T	Gen ARN Ribosómico 16 S GCCAGCAGCCCGGTAATACATTAGGTTGCAAGCGTTATCCGGAATTTATGGGCGTAAAGCGGCT GTAGGTTTTGTTAAGTCTACGCTCAAATTTGGGGCTCAACCCCAACCCGCGTTGGATACTGGCA TACTAGAGTTTATGAGAGGTTAGCGAAATCTTGTGAAGCGGTGGAATCGGTAGATATAAGGAAG AACACCAATATGGCGAAGGCAGCTAAGTGGACATATCTGACACTGAGAGACGAAAGCGTGGGGA GCAACAGGATAGATACCTCGTGTAGTCCACGCCCTAAACGATGATCATTAGCTGATGAAAATTTCA TCGGCGCAGTAAACGATTAAATGATCCGCTGAGTAGTACGTTGCAAGAAATAAAACTTAAAGGA ATTGACGGGGTCCGCAAGCGGTTGGAGCATGTGGTTAATTTGAAAGTACGCGTGAAGAACTTCA CCACTCTTGACATCTTCTGCAAGCTATAGAGATATAGTAGAGTTAACAGAAATGACAGATGGTGCA TGGTGTCTGCTGAGTCTGCTGAGATGTAGGTTAAGTCTGCAACGAGCGCAACCTTGTCTCT AGTTACTAACATTAAGTTGAGCACTCTAAGGAGACTGCCCGAGTAAATGGGAGGAAAGTGGGGAC GACGCTAAATCATCATGCTCTTACGAGTGGGGCAACACAGCTGCTCAATAGTGGTGAACAAGAG AAGCAAACTGGTGACAGGGAGCAACCTCAAAAAACCGATCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACT CGACTACATGAAGTCGGAATCGTAGTAACTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT GTCTTGTACACACCCCGCTCAACCATGGGAGCTGGTAATGCCGAAGTCGGTTTAAACAAACT GCCTAAGGCAGGACTGGTACT	99 % <i>Mycoplasma columbinum strain MMP-1 NR_025063.1</i> 98 % <i>Mycoplasma iners strain 89R- D-3 FJ666133.1</i> 98 % <i>Mycoplasma gallinarum strain B2 (Dinter) FJ666137.1</i> 97 % <i>Mycoplasma columbinasale strain 694 NR_025062.1</i>
Aquila adalberti	T475T	Región intergénica (ISR) GGGCTTGTACACACCCCGTCAACCATGGGAGCTGGTAATGCCGAAGTCGGTTTATAAACAA ACTGCCTAAGGCAGGACTGGTACTGGGGTAAAGTCGTAACAAGGATCCCTACGAGAACGTTGGG GATGGATCACTCCTTCTACGGAGTACATTAAGAAATCAATTTGGAATATGRATTCACTTAACT TAAATTTAATAATTTGACCTAACATCATTATATATATCAACAGTCAATGGCTTTTATAGGTCAT AAGCATTATGCTAGTTTTGAGAGAACATCTCTCAATTTGTTCTTGGAAACTGAATAGTAAATTTAT TAAATATTTACAACGACATCTAAACAAATAAATTTAAATTTAGTCAATTTGTTTGTATCATCGA	98 % <i>Mycoplasma gypis strain ATCC 51370 AY816337.1</i> 97 % <i>Mycoplasma gypis 16S-23S intergenic spacer, type strain BT1/T1AJ780995.1</i> 84 % <i>Mycoplasma sp. Mirounga ES2774-NASSP4 GU905029.1</i>

		<p>Región intergénica (ISR) CCTTCTACGGAGTACACACTTCTGTTATGGAAAAATTTTGTATCCAGTTTTGAG AGACTTATCTCTTTTGTCTTTGAAACTGAATATCGACATTGAAAAATTTAA TTAATATTTCAAAGTTTATAGTCAACCTATAGAATACAAAATATAGACAACAATAGG TCATACAAACATTAATAAACAACAAAAAC</p>	<p>94 % <i>Mycoplasma sp. Sgv2c</i> GQ150566.1</p> <p>94 % <i>Mycoplasma sp. Sgv2b</i> GQ150565.1</p> <p>94 % <i>Mycoplasma sp. Sgv2d</i> GQ150567.1</p> <p>93% <i>Mycoplasma sp. Sgv2e</i> GQ150568.1</p> <p>93% <i>Mycoplasma falconis</i> ATCC 51372 AY766087.1</p>
		<p>Región intergénica (ISR) ACACACCGCCGTCACACCATGGGAGCTGGTAATGCCGAAGCCGGTTAGTTAAC TTCGGAGCAGACTGTCTAAGGTAGGACTGGTACTGGGGTGAAGTCGTAACAAG GTATCCCTACGAGAACGTGGGGATGGATCACCTCCTTTCTACGGAGTACAAAAGTA CACACTTAAAGATTTATAATCTTTTACTATTATTATTGATTAGAAATTTTATA TCCAGTTTGAGAGTATTATCTCTAGTATTCTTTGAAAACCTGAATAGAAAAGA CATTGTATATATTAATATTCAACGTTTTGATCAACCTATAGAATACATCATATC TAATTTCTAATTTTTAAACAATTAGGACAATAGGTCATACTATTAATAAGTAAGA GTTTTGGTGGATGCC</p>	<p>98 % <i>Mycoplasma gypis strain</i> ATCC 51370 AY816337.1</p> <p>97 % <i>Mycoplasma gypis</i> 16S-23S intergenic spacer, type strain BT1/T1AJ780995.1</p> <p>84 % <i>Mycoplasma sp. Mirounga</i> ES2774-NASSP4 GU905029.1</p>
<i>Aquila crysaetus</i>	T517T	<p>Región intergénica (ISR) TTGTACACCCGCCGTCACACCATGGGAGCTGGTAATGCCGAAGCCGGTTAGT TAACTTCGGAGACGACTGTCTAAGGTAGGACTGGTACTGGGGTGAAGTCGTAAC AAGGTATCCCTACGAGAACGTGGGGATGGATCACCTCCTTTCTACGGAGTACAAA GTACACACTTAAAGATTTATAATCTTTTACTATTATTATTGATTATGGAAGTATTT ATATCCAGTTTGAGAGTATTATCTCTAGTATTCTTTGAAAACCTGAATAGAAA AGACATTTGTATATATTAATATTCAACGTTTTGATCAACCTATAGAATACATCA TATCTAATTTCTAATTTTTAAACAATTAGGACAATAGGTCATACTATTAATAAGTA AGAGTTTTGGTGGATGCCCTGGGTCTGGAAGTCGATGAAGGACG</p>	<p>98 % <i>Mycoplasma gypis</i> 16S ribosomal AY772219.1</p> <p>97 % <i>Mycoplasma gypis</i> 16S-23S intergenic spacer, type strain BT1/T1 AJ780995.1</p>
	T491T	<p>Región intergénica (ISR) TTGTACACCCGCCGTCACACCATGGGAGCTGGTAATGCCGAAGCCGGTTAGT TAACTTCGGAGACGACTGTCTAAGGTAGGACTGGTACTGGGGTGAAGTCGTAAC AAGGTATCCCTACGAGAACGTGGGGATGGATCACCTCCTTTCTACGGAGTACAAA GTACACACTTAAAGATTTATAATCTTTTACTATTATTATTGATTATGGAAGTATTT ATATCCAGTTTGAGAGTATTATCTCTAGTATTCTTTGAAAACCTGAATAGAAA AGACATTTGTATATATTAATATTCAACGTTTTGATCAACCTATAGAATACATCA TATCTAATTTCTAATTTTTAAACAATTAGGACAATAGGTCATACTATTAATAAGTA AGAGTTTTGGTGGATGCCCTGGGTCTGGAAGTCGATGAAGGACG</p>	<p>98 % <i>Mycoplasma gypis</i> 16S ribosomal AY772219.1</p> <p>97 % <i>Mycoplasma gypis</i> 16S-23S intergenic spacer, type strain BT1/T1 AJ780995.1</p>
<i>Ardea cinerea</i>	T136T	<p>Gen ARN Ribosómico 16 S GAGTTTTCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCTGTGGCCATAATACATGCATGTCGAGCGGAGT TCTTTGAACTTAGCGGAATGGGTGAGTAACACGTAATTAACGTACTTTAGACTGGGACAAAG ATGAGAAATTTCCGTAATACCGGACTTATAGAGACACATGTCCTTATATAAAAGGAGCCTTC AAGCTCCACTAGAAGATCGGGTGGTGGTACTAGCTAGTTGGTAAGTAATGGCTTACCAAGGCT ATGATGTTTAAAGCGGTTGAGAGACTGAACGTCACACTGGGACTAGATACGGCCCACTCCTCA CGGGAGCAGCAGTAGGGAAATTTTCAACAATGGCGAAAGCTGATGGAGCAACACAGCGTCGAG GATGAAGCCCTCGGTTGTAACCTGCTGTTATTAGGATGAAAATAATGAGAGGAATGCTATT ATCTTGACGTAATAACAGAAAGCAACGCTAACTATTGCGCAGACCCGGTAATACATAGG TTGCAAGCTTATCGGAATTTTGGCGTAAGAGCGTCTGTAGTTGTTTAAAGTTGGCGTCAA AACTTGGGGCTCAACCCAAATCGCTGGATTAAGTACTGGCAAACTAGAATTGTTAGAGTTAATGGA ATTCTTGTGAAGCGGTGAATGCGTAGATATAAGGAAGAACCAACATGGCGGAAGCAATTAAC TGGGCACATTTGACACTGAGAGACGAAAGCGTGGGGAGCAACACGAGATTAGATACCTGGTAGT CCACGCTGTAAGGATGATGATTAAGTAAAGCAACCTTGGCAGACTAACGATTAATCATCCG CCTAGTAGTATGCTCGCAAGAGTAACTAAAGAAATTCACGGGATCCGCAAGCGGTGGA GCATGGTTTAAATTTGAAGTACGGTAGAACCTTCCCACTCTTGACATCTCTGCAAGCTATAG AGATATAGTGGAGTTAACAAGAAAGACAGATGGTGCATGGTTGCTGCAAGCTCTGTCTGAGATG TTGGTTAAGTCTGCAAGCGCAACCTTGTCTTATGTTAAATTTCTAAGGAGACTGCCGGG TAACTGGGAGGAAGGTGGGACGACTCAAAATCATGCTCTTACGAGTGGGGCAACACACTG GCTACAAATGGATGTACAAAGAGAAAGCAATACGACGACGTGGAGCAAATCTCAAAAACCATCTC AGTTCGGATTGATGCTGCACTGACTACATGAAGTGGGAATCGCTAGTAATCTGATAGACGACTAC GCTACGGTGAATACGTTCTGGGCTTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGCTGTAATGCC GAAGTGGTTTTGCACTACGGAGCAACTGCTAAGGCAAGGACTGTGACTGGTGTGAAGTCGT AACAGGTTATCCCTACGAGAACGTGGG</p>	<p>97 % <i>Mycoplasma sp. 1449 partial</i> 16S rRNA gene, type strain 1449T. FM196533.1</p> <p>96 % <i>Mycoplasma verecundum</i> AF412989.1</p> <p>94 % <i>Mycoplasma edwardii</i> 16S ribosomal RNA gene sequence. U73903.1</p> <p>96% <i>Mycoplasma sp. SF9</i> EU544228.1</p> <p>96 % <i>Mycoplasma sp. M222-5 clone</i> 1 EU684058.1</p>

Región intergénica (ISR)		
<p>GGGAGCTGGT AATGCCGAA GTCGGTTAG TCAACTACGG AGACAACTGC CTAAGGCAGGACTGGTACT GGGGTGAAGT CGTAACCAAGG TATCCTTAGC AGAACGTGGGGATGGATTACTCTCTTTCTA CGGAGTACAC ATAAATAACA TTTATTGTTA CTTAATTACC TTTTATAAAACAAATAAT TTTGTCATGG GATAATATA GTTTTGAGAG RACTTTCTCT CAATGTTCTTTGAAAACGTA ATAGTAAAGA TATTAATATA ACAACGCAT CAAAAAATAA ATTAGCAATTTGTTTTGTG ATACCGAGAA ATTATTAGAA ATAATAATC GTTAAATGT CTTTGAATACATCAACAACA ATAGGAAAAT ATTTGTACAA CTTTTAAATA AGTAAGAGTT TGTGGTGGATGCCTTGGGTC TGAAGTCGA TGAAGGACGT GATTACCTGC GATAAGCCTC GTGGAGCTGGATATAAGCAA CGAACCGGG GATTTCAWNG GGGGGGAANCCCA</p>		
Asio otus	Gen ARN Ribosómico 16 S	
	<p>TGCCTCTAGATGGATAACGCTGAGAAATTAGCCCTAATGCCGATACTTATTAGTTTCGCATGAAAT TAATATAAAGGAGCGTTTCTTCACTAGAGGATCGGGTGCCTAACATTAGCTAGTTGGTAAGGT AATGGCTTACCAAGCGATGATGTTTACGGGGTTGAGAGACTGATCCGCCACTGGGACTGAGA TACGGCCAGACTCTACGGGAGGACGAGTAGGGAATTTCCACAATGGACGAAAGCTGATGGA GCGACACAGCGTGCAGATGAAGGCTTGGGTTGTAACCTGCTTTAAGGGAAGAAAAAACA GAGGAGAAATCCTTTTGTGACGGTACCTGTGCAAGAACCGGTAACATATGTCACGAGCAG CCGCGTAATACATAGGTTGCAAGCGTTATCCGGAAATTTGGCGGTAAGCGCTGTAGGTTGTG TGTAACTGACGTAATAAATCGGGCTCAACCCCAATAGCGTTGGATACTGGCAGCGTGAAT GTGTAGAGTTAGCGGAATCCTAGTGAAGCGGTGAATGCGTAGATATTAGGAAGAACATCAACA TGCGAAGGCAGCTAATGGGCACATATTGCACTGAGAGACGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGG ATTAGTACCTGTAGTCCAGCGGTAAACGATGATGATTAGCTGATGGGAACCATCGGCGCAGC TAACGATTAATCATCCGCTGAGTATGACGCAAGTGTGAAACTTAAAGGAATTGACGGGG ATCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGTTAATTTGAAGATACGCGTAGAACCTTACCACTCTTGAC ATCTTCCGCAAGCTATAGAGATATAGTGAGGCTAACCGAATGACAGATGGTCATGTTGTCGT CAGCTCGTGTGAGATGTTGTTAAGTCTGCAACGAGCGCAACCTTGTCTTGTAGTAGATGA TCTAAGGAGACTGCCGAGTAATCCCGGAGGAAGTGGGGCAGCAGTCAAATCATCATGCCTTCA CGAGTGGGGCAACACAGTCTCAATGAGCGGTACAAGAGAAAGCAAGACAGCGATGTGGAGCA AATCTCAAAAACCGTTCTCAGTTCGATTGATGTCGCACTCGACTACATGAAGTCGGAATCGCT AGTAATCGTAGATCAGCTACGCTACGGTGAATACGTTCTGGGCTTGTACACACCGCCGTCACAC CATGGGAGCTGTAATGCCAAAGTCGTTTTTAACTACGGAGCAACTGCCTAAGGCAGGACT GGTGACTGGGTGAAGTCAACCCAT</p>	<p>99 % <i>Mycoplasma sp. M200-2</i> clone 2 EU684060.1</p> <p>99 % <i>Mycoplasma sp. M26 16S</i> ribosomal RNA gene, partial sequence. EU660528.1</p> <p>99 % <i>Mycoplasma sp. M209-7</i> clone 2 EU684061.1</p> <p>97% <i>Mycoplasma gallopavonis</i> strain WR1 FJ226577.1</p> <p>97 % <i>Mycoplasma buteonis</i> strain <i>BbT2g</i> NR_025177.1</p>
	T12T	
Región intergénica (ISR)		
<p>TTGTACACACCGCCCTCACACCATGGGAGCTGGTAATACCCAAAGTCGGTTTGT AACCTCGGAGGCGACCGCTAAGGTAGGACTGGTACTGGGGTGAAGTCGTAAC AAGGTATCCCTACGAGAACGTGGGGATGGATCACCTCTTTCTACGGAGTACACTT AGTTATGGAATAATTTGTATCCAGTTTTGAGAGATTTATCTCTACTGTTCTTT GAAAACCTGAATTCGACATTGATATAATTAATTTTCAAAGTTTAGATCAACCT ATAGAATTTTATAAAGACAACAATAGTCTACAACAACAAATCAAATATAACGAAA CAACTATTAACAAGATAAAGATTTTTGTTGGATGCCTTGGGTCTGGAAGTCGAT GAAGGACGTG</p>		<p>97 % <i>Mycoplasma spumans</i> AF538684.1</p> <p>92 % <i>Mycoplasma phocidae</i> strain C264-NAS GU905028.1</p> <p>92 % <i>Mycoplasma falconis</i> ATCC 51372 AY766087.1</p>
T199T		
Athene noctua	Región intergénica (ISR)	
	<p>AGTCGGTTTTGTTACTACGGAGACAACGCCTAAGGCAGGACTGGTACTGGGGT GAAGTCGTAACAAGGTATCCCTACGAGAACGTGGGGATGGATCACCTCTTTCTA CGGAGTACAAAACAGCTAAAGCTGACTTATATACCTTTTTATTATTATTTAA GTCATGTAATATCTAGTTTTGAGGAACTCCCTCATATATGTTCTTTGAAAACG AATAGTTAAAGTAAAGATATTAATAACAACGACATCAAAAATAAATAGTCAAT TTGTTTTGTGATACCRAGAATTTATTAGAAATAATAATTCGTTAAAATGCTTTGAA TACATCAACAATAGTAAATATTGWTATTAATCTTTAAAATAAGTAAGAGTT</p>	<p>87 % <i>Mycoplasma verecundum</i> AY781781.1.</p> <p>86 % <i>Mycoplasma sp. 1449</i> FM196533.1</p> <p>85 % <i>Mycoplasma sp. Sgv1a</i> GQ150562.1</p> <p>84 % <i>Mycoplasma gallinaeum</i> AY729927.1</p>
	T496T	
Región intergénica (ISR)		
<p>TTGTACACACCGCCCTCAACCATGGGAGCTGGTAATGCCGAAAGTCGGTTTATA AACAACTGCCTAAGGCAGGACTGGTACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTATCC CTACGAGAACGTGGGATGGATCACCTCTTTCTACGGAGTACAAAATAATCTCT ACAGCAGATTTAAACCTTATTATCAGACCTTTTATACAACCGCTATGTGCTTTTT ATAGGCTAAAAAGCTTATATCTAGTTTTGAGAGAACATATCTCTCAATTGTTCTTT GAAAACCTGAATAGTAAATTTAAAATATTACAACGACATCTTAATAAATAAAT AATCAAAATAAGGTTTATTTGTTGATTATCGAGTAATCATATAACACATATGAT TCATTGAAATGCTTAAAATACACATCAACAAAACATAAACAATAGGAACATACT TTTAAATAAGTAAGTTTTGTTGGTGGATGCCTTGGGTCTGGAAGTCGATGAAGGA CGTG</p>		<p>88 % <i>Mycoplasma lipofaciens</i> strain ATCC 35015 AY755604.1</p> <p>86 % <i>Mycoplasma iners</i> strain 89R- D-3 FJ666133.1</p> <p>85 % <i>Mycoplasma sp. Mirounga</i> ES2805-ORL GU905031.1</p> <p>85% <i>Mycoplasma fermentans JER</i>, complete genome CP001995.1</p>
T500T		

Burhinus oedicnemus	<p>T4C</p> <p style="text-align: center;">Región intergénica (ISR)</p> <p>AAGTCGGTTTTGCTAACCTCGGAGGCGACCGCCTAAGGTAGGACTGGTACTGGG GTGAAGTCGTAACAAGGTATCCCTACGAGAACGTTGGGATGGATACCTCCTTT TACGGAGTACAACCTCTGTTATGGAATAATATTTGATCCAGTTTTGAGAGTACTA ACTCTCTTTTGTCTTTGAAAACGAATATCGACATTGAAAATTAATTAATAT TTCAAAGTTTGTAGTCAACCTATAGAATACAAAATATAGACAACAATAGGTCATAC AACAACATAAACAACAACCTATTAACAAGATAAGATTTTTGGTGAATGCCTTG GGTCTGGAAGTCGATGAAGGAC</p>	<p>100% Mycoplasma falconis 16S-23S intergenic spacer, type strain H/T1T. AJ780990.1</p> <p>100 % <i>Mycoplasma falconis</i> ATCC 51372 AY766087.1 93% <i>Mycoplasma hominis</i> strain PG21, chromosome, complete genome FP236530.1</p>
	<p>T4T</p> <p style="text-align: center;">Gen ARN Ribosómico 16 S</p> <p>TTCTGATTTACTGGGGTAAAGAGAGCGCGGGCGGATCTGCAAGTCTGGTGAATAACAACCTGCT TAACGGTTGATGCTGGAACTGCAATCTAGAGTGTAGTAGAGGTTTTGAACTCCATGGG AGCGGTGGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACAACAGTGGGGAAGCGGAAACTGGGCTATTACT GACGCTTATGCTGAAAGTGTGGGAGCAATAGGATAGTACCTAGTAGTCCACCGCTAAAC GATGGTAATAAATGTTGGCATGGAATATGTCGGCTGGCAGTTAACACATTAAATACCCTGG GTAGTACATTGCAAGAAATGAACTCAACCGAATGACGGGGACCCGCAAGTGGTGAAGCAT GTTGCTAATTCGACAAATACGTAACCTTACTGGGTTTGAATCTTTGCAAGCTATAGAGAT ATAGTGGAGGTTAACAGAGTACAGGTGGTGCATGGT</p> <p style="text-align: center;">Región intergénica (ISR)</p> <p>CTTGACACACCCCGCTCAACCTAGAGAGCTGTAATACCTAAAACCGTTAAGATAACCTCGTGA GTCTTGGCTAGGGTAGGACTGGTGGATTGAGTTAAGTCGTAACAAGTACCCTACGGGAATGT GGGGTGGATCAGCTCTTCTAACGGAGTAAATTAATTTTAAATTAACACTTTTAAATAGTGTA CTTTATATAAAAATCCAGTATTACTTAAAACCCAAATGAATTTTAAATGAATAACAGGTCCGATTC TATTAGTTTTGAGAGATATATCTCTCATGATAGTCTTTGAAAACGAATATTAAACAATCTTTT AGTCTAATCATATGAAAAATAATAAGGATACATAAATAGTTACTAAGGG</p>	<p>100 % Mycoplasma iowae strain HTL04-4846A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. EF447273.1</p> <p>99 % <i>Mycoplasma iowae</i> 16S rRNA gene, complete sequence, and 23S rRNA gene, partial sequence. U29676.1 98 % <i>M. iowae</i> 16S ribosomal RNA small subunit M24293.1</p>
	<p>T245T</p> <p style="text-align: center;">Gen ARN Ribosómico 16 S</p> <p>CTTCGGAGGTCGACGCTTACCGGATTATTGGGCGTAAAGCGTTCTAGGCTGTTGTTAAGTCT GGAGTCAAATCCCGGGCTCAACCCCGTCCGCTTTGGATACCTGCAACCTAGAGTTAGATAGAGG TAAGCGGAATCCATGTGAAGCGGTGAATGCGTAGATATATGGAAGAACAACAAAGCGAAGGC AGCTACTGGGCTACAGCTGAGGACGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATAGATACCTC TGGTAGTCCACCGCTAAACGATGATCATTAGTCTGGTGGAGAGTTCACTGACGAGTAAACGATT AAATGATCCGCTGAGTATGCTGCAAGAGTGAACCTAAAGGAATGACGGGGACCCGACACA AGCGGTGGAGCATGTGTTAATTTGAAGTACACGAGAACCTTACCCACTCTTGACATCTCCGC AAAGCTATAGAGATATAGTGGAGTTAAAGGAATGACAGATGTCATGTTGTCGTCAGCTCGTG TCGTGAGATGTTGGTTAAGTCTGCAACGAGCGCAACCTCTATTAGTTACTAACGAGTTATGC GAGGACTCTAGAGATAGCTGGTAACTGGGAGGAAAGCGGGGATGACCTCAATCATCATGC CTTTACGAGTGGGGCTACACAGTGTCTCAATGTCGGTACAAAGAGAAAGCAATATGGCGACATG GAGCAATCTCAAAAGCCGATCTCAGTTCGGATGGAGTCTGCAATTCGACTCCATGAAGTCGGA ATCGTAGTAAATGCGAGATGAGCTATGTCGGGTGAATGCTTCTGGGTTCTGACACACCGCCCG TCACACCTGGGAGCTGATTTCCAAAGTGGTTGCAACCTCGGAGCGACCGCTAAGGTA GGACTGGTACTGGGGTGAAGTGTAAACAAGTATCCCTACGAGAACGTTGGGATGATCACTC CTTTACGAGTACACTAGTTATGGAACGAATATTTGATCCAGTTTTGAGAGAAATATCTCTCT TTTTGTTTGAAGAACTGAATAACGACATTGATATTTAATTAATTTCAAAGTTTATGATCAACT ATAGAATTTATAGACAACAATAGGTCATACAACAATTAACAACAACAACCTATTAACAAGA TAAGATTTTTGGTGGATCCTTGGTCTGGAAGTCGATGAAGGACGTCGCAACCTGCGA</p> <p style="text-align: center;">Región intergénica (ISR)</p> <p>CTACGGAGTACACTTAGTTATGGAACGAATATTGTATCCAGTTTTGAGAGAATATATCTCTTTTT GTTCTTTGAAAACCTGAATAACGACATTGATATTTAATTAATTTCAAAGTTTATGATCAACTATA GAATTTTATAGACAACAATAGGTCATACAACAATTAACAACAACAACCTATTAACAAGATAA GAGTTTTGTGGATGCTTGGTCTGGAAGTCGATGAAGGACGTCGCAACCTGCA</p>	<p>97% Mycoplasma spumans AF538684.1</p> <p>94% <i>Mycoplasma phocidae</i> strain CSL 4957 DQ523533.1 96 % <i>Mycoplasma sp. Sgv2b</i> GQ150565.1</p> <p>94 % <i>Mycoplasma hominis</i> strain PG21, chromosome, complete genome FP236530.1</p>
	<p>T304T</p> <p style="text-align: center;">Gen ARN Ribosómico 16 S</p> <p>CTGAGAGTTTATGCTGCTCAGGATGAACGCTGGCTGTGTCCTAATACATGTCATGTCGAGCGAT GCTAGCAATAGCATAGCGGCAATGGGTGAGTAACACGTAACCTCAACGACTCTCAGATTTGGGATA GCGAACGAAACGTTGATAAACAATACTATTAGAGTTCGATGACTTTAATAAAGGAGC GTTTCTTCTGAGAGATCGGGTGGCAACATTAGCTAGTTGGTGGAGTAAACGGCCCAACAAAG CGATGATTTAGCGGGTTGAGAGACTGAACCGCCACTGCGGACTGAGATACGGCCCAAGCTCC TACGGGAGCAGCAGTAGGGAATATTCCAATGAGCGAAAGCTTATGAGGAGCAGACAGCGTCC AGGATGAAGTCTTATGATGTTGAAACTGCTGTGGTGAAGGAAAGAAAGTATGATGGAGAAATGA CATTACTTGCAGGCTTATTAGAAAGCAACCGCTCACTATGTGCCAGCAGCGCGGTAATACAT AGGTTGCAAGCTTTATCCGGAATTTATGGGCGTAAAGCGTCTGATGTTGTTTAAAGTCTGGCG TCAAATTTGGGGCTCAACCCCAACCGGTTGGATACCTGGCAGACTAGAGTTATGAGAGTTAGC GGAATCTTGTGAGCGGTTGAATGCTAGATATAAAGGAACAACCAATTTGGCGAAGGCGACT AACTGGGCATCACTGACACTGAGAGCAGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATGATGATCCCTGGT AGTCAACCGCTTAAACGATGATCATTAGCTGATGGAAATTTATCGGCGCAGCTAACGCTTAAATG ATCCGCTGAGTATGATCTGCAAGAAATAAACTTAAAGGAATGACGGGGATCGGCAACAGCGG TGGAGCATGTTAATTTGAAGTACGCGTGAAGCCTTACCACCTCTGACATCTCTGCAAGGCT ATGAGACATAGTGGAGTTAAACAGAAATGACAGATGTCATGTTGTCGTCAGCTGTCGTGTA GATGTTGTTAAGTCTGCAACGAGCGCAACCTTACTTCTGATGACTCAATTAAGTTGAGGACTC TAAGGAGACTGCCGAGTATCGGGAGGAGGTTGGGACGACGCTCAATCATGCTCTTACG</p>	<p>99% Mycoplasma sp. 72CL partial 16S rRNA gene, strain 72CL. FM878039.1</p> <p>99% <i>Mycoplasma sp. 34CL</i> partial 16S rRNA gene, strain 34CL. AM182892.1 99% <i>Mycoplasma sp. 10T3</i> partial 16S rRNA gene, strain 10T3. AM182890.1</p>

	<p>AGTGGGGCTACACAGCTGCTCAATGGACGGTCAAAAGAGAAGCGAAGTGGTACATGGAGCAA CCTCAAAAAACCGTTCTCAGTTCCGATTGAAGTCTGCACTGCACTCATGAAGTCGGAATCGTAG TAATCGTAGACTAGTACGCTACGGTGAATACGTTCTGGGCTTTGACACACCCCGCTCAAACA TGGGAGCTGTAATGCCGAAGTCGGTTTAAAGAACTGCTAAGCGAGGACTGGTACTGGG GTTAAGTCGTAACAAGGTATCCCTACGAGAAGCTGGG</p> <p>Región intergénica (ISR)</p> <p>TGGTTTAAAGAACTGCCTAAGGACGAGCTGGTACTGGGTTAAGTCGTAACAAGGTATCCC TACGAGAACCTGGGATGGATTACCTCTTCTACGGAGTACAAAAAGTATTTTATAGACTTAT TTAACAACTACTAAGTACGCTGTACAAATAATTAACGCTCATGACTTTTATGGTGAAG TCTTATATAGTTTTGAGAGCAAACTCTCTATTGTTCTTTGAAAAGTAAAGTAAATTTTT CGAATTTACACGACATCAATAAATAAATTTTGGTAAATTTGTTTGTATCATCGAGTAATCAT TAAATATGATTCAATGAAATGTTAAATAACACATCAACATAACAAACATAGGAAATACTAC TTTTAAATAAGGAAGT</p>	<p>99 % <i>Mycoplasma sp.</i> 98 CL 1 partial 16S rRNA genes, strain 98CL1. FM878040.1</p> <p>98 % <i>Mycoplasma sp.</i> 39CL partial 16S rRNA gene, strain 39CL AM182895.1</p>
<p>T138T</p>	<p>Gen ARN Ribosómico 16 S</p> <p>ACTATGTGCCAGCAGCCGGTAATACATAGTCCGAAGCTTATCCGGAATTTGGGCGTAAAG CGTTCGTAGTTGTTTAAAGTCTGAAGTTAAAGCTGGGGCTCAACCCAGCCCGTTAGATAC TGTAAACTAGAGTGAGATAGAGGTAAGCGGAATTCATGTGAAGCGGTAAGTGGTATAGATA TGGAGAACAACAAAGCGAAGCGAGCTACTGGGCTATACGACACTGAGGACGAAAGCGGT GGGAGCAACAGGATTAGATACCTGTAGTCCACGCTGTAACGATGATCATTAGTGGTGGAGA ATTCAGTACGAGCTACGCAATAAATGATCCGCTGAGTATGCTCGCAAGAGTGAACCTTAA AGGAATGACGGGACTCGCACAGCGGTGGAGCATGGTTAATTTGAAGTACCGGAGAAC CTTACCCACTCTTGCATCTCCGCAAGCTATAGAGATATAGTGGAGGTTAACGGAATGACAGATG GTCCATGGTTGCTGCTAGCTGCTGCTGAGATGTTGCTTAAAGTCCGGCAACGAGCGCAACCCCT ATCTTCACTTAAACAAGTAAGTTGAGAACTTGGAGATACGCTGGGTAAACAGGAGGAAAG TGGGATGACGCTCAAACTCATGCTCTTATGAGTGGGCGCACACGCTGCTACAATGGTGGGA CAAAAGAGCAAGACAGTATGTTGGAGCAAACTCAAAAAGCCGATCAGTTGGATTGAAGTC TGCAACTGCACTTATGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGCAGGTCAGCCATACTCGGTTGAATACGT TCTCGAGTCTTCCACACCCGCTCCACCCAGGGAGCTGGTCTCCGAAACCCGGTTAGTCAA CTTCGGAGAACCCCTAATAGCTAGGACTGGTCCAGGGAGAAATATTCAACTCA</p> <p>Región intergénica (ISR)</p> <p>CTACGGAGTACATAGTACAAAAATTAAGCATTATTAGATTATGAAAAACATTTATCCAGTTTTG AGAGATTTATCTTAAAAATATAGATCTTTGAAAACTGAATTGAAAAGACATTTGATATATAAATA TTAATATTCAACCGTTTTGATCAACCTATAGAATACATCATATCTAATTTCAATTTAAATATGACAA TAGGAACATACTATAAATAAGTAAGATTTTTGGTGGATGCCTTGGGGCTCGGAAGTCGATGAAG GAC</p>	<p>98 % <i>Mycoplasma gypis</i> strain B1/T1 NR_024982.1</p> <p>95% <i>Mycoplasma sp.</i> <i>Mirounga</i> ES2774-NAS GU905026.1</p> <p>95 % <i>Mycoplasma sp.</i> Sgv2d GQ150567.1</p>
<p>Buteo buteo</p> <p>T106T</p>	<p>Gen ARN Ribosómico 16 S</p> <p>ACTATGTGCCAGCAGCCGGTAATACATAGTCCGAAGCTTATCCGGAATTTGGGCGTAAAG CGTTCGTAGTTGTTTAAAGTCTGAAGTTAAAGCTGGGGCTCAACCCAGCCCGTTAGATACT GGTAACTAGAGTGAGATAGAGGTAAGCGGAATTCATGTGAAGCGGTAAGTGGTATAGATA GGAAGAACAACAAAGCGAAGCGAGCTACTGGGCTATACGACACTGAGGACGAAAGCGTGGG GAGCAACAGGATTAGATACCTGTAGTCCACGCTGTAACGATATCATTAGTGGGAGGATT CACTGACGAGCTAACGCAATAAATGATCCGCTGAGTATGCTCGCAAGAGTGAACCTTAAAG GAATGACGGGACTCGCACAGCGGTGGAGCATGGTTAATTTGAAGTACCGGAGAACCTT ACCCTCTTGACATCTCCGCAAGCTATAGAGATATAGTGGAGGTTAACGGAATGACAGATGGT GCATGTTGTCGTCAGCTGCTGCTGAGATGTTGGTTAAAGTCCAGCAACGAGCGCAACCCCTATT TTCAATTAACAGTAAGTCTGAGGACTTTGGAGATACGCTGGGTAAACAGGAGGAAAGGTGG GGATGACGCTCAAACTCATGCTCTTATGAGTGGGCGCACACGCTGCTACAATGGTGGTACAA AGAGACGCAATACGGTGCAGTGGAGCAAACTCAAAAAGCCGATCAGTTGGATTGAAGTCTG AACTCGACTTCAAGAGTGGAAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCCATACTCGGTTGAATCGTCT CGAGTCTTACACCCGCTCACACCTAGGAGCTGTAATGCCGAAGCCGGTTAGTTAACTTCG GAGACGACTGCTAAGGTAGACTGGTGA CTGGGTGAA GTCGTAACAA GG</p> <p>Región intergénica (ISR)</p> <p>TTGTACACACCCCGCTCACACCAAGGGAGCTGGTAATGCCGAAGCCGGTTAGTTAACTTCGGAG ACGACTGCTAAGGTAGGACTGTGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTATCCCTACGAGAACGTG GGGATGATCACTCTTCTACGGAGTACAAAGTACACACTTAAAGTAAATACTTTTACTTAT TTAATTTGATTATGAAATTTATCCAGTTTTGAGAGTATTATCTCTCTAGTTAGTTCTTTGAAAA CTGAATAGAAAAACATTTGATATTAATAATCAACGTTTTGATCAACCTATAGAATACATCATCTA AATTTCTAATTTAATAA AATTAGACAATAGGTCATACTTTAAATAAGTAATCATACTATTAATAAGTAAATAAGTAA</p>	<p>99% <i>Mycoplasma gypis</i> strain B1/T1 NR_024982.1</p> <p>96 % <i>Mycoplasma zalophi</i> strain CSL 7640 FJ876268.1</p> <p>96 % <i>Mycoplasma sp.</i> <i>Mirounga</i> ES2774-NASSP4 GU905029.1</p> <p>96 % <i>Mycoplasma sp.</i> 15CL2 AM182894.1</p>
<p>T58T</p>	<p>Gen ARN Ribosómico 16 S</p> <p>ACTATGTGCCAGCAGCCGGTAATACATAGTCCGAAGCTTATCCGGAATTTGGGCGTAAAG CGTTCGTAGTTGTTTAAAGTCTGAAGTTAAAGCTGGGGCTCAACCCAGCCCGTTAGATACT GGTAACTAGAGTGAGATAGAGGTAAGCGGAATTCATGTGAAGCGGTAAGTGGTATAGATA GGAAGAACAACAAAGCGAAGCGAGCTACTGGTCTACTGACACTGAGGACGAAAGCGTGGG GAGCAACAGGATTAGATACCTGTAGTCCACGCTGTAACGATATCATTAGTGGGAGGATT CACTGACGAGCTAACGCAATAAATGATCCGCTGAGTATGCTCGCAAGAGTGAACCTTAAAG GAATGACGGGACTCGCACAGCGGTGGAGCATGGTTAATTTGAAGTACCGGAGAACCTT ACCCTCTTGACATCTCCGCAAGCTATAGAGATATAGTGGAGGTTAACGGAATGACAGATGGT GCATGTTGCTGTCAGCTGCTGCTGAGATGTTGGTTAAGTCCAGCAACGAGCGCAACCCCTATT TTCAATTAACAGGTAAGTCTGAGGACTTTGGAGATACGCTGGGTAAACAGGAGGAAAGGTGG GGATGACGCTCAAACTCATGCTCTTATGAGTGGGCGCACACGCTGCTACAATGGTGGTACAA AGAGACGCAATACGGTGCAGTGGAGCAAACTCAAAAAGCCGATCAGTTGGATTGAAGTCTG AACTGACTCATGAAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCCATACTCGTGGATTGAAGTCTG CACTGACTCATGAAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCCATACTCGGTTGAATAGTCTT</p>	<p>99% <i>Mycoplasma gypis</i> strain B1/T1 NR_024982.1</p> <p>96 % <i>Mycoplasma zalophi</i> strain CSL 7640 FJ876268.1</p> <p>96 % <i>Mycoplasma sp.</i> <i>Mirounga</i> ES2774-NASSP4 GU905029.1</p>

<i>Calonectris diomedea</i>	T230T	<p>Región intergénica (ISR)</p> <p>CGTGTGCTAACCGCAAGGAAAGCGCATGCTAGGGTAGGGCCGGTATTGGAGTT AAGTCGTAACAAGGTACCCCTACGAGAACGTGGGGTGGATTACCTCTTTCTAT GGAGTATATAACTACTAACAGATATACCTGTACATATAACGGTGAATAA TAAAAACCAACAAAAGGTTAAACCCATTAAGCAAAATTTAACTAAAAGTTGT TGTCAGATTCTGTCAGTTATCAAGGGGCATT</p>	<p>95 % <i>Mycoplasma imitans</i> AB098503.1</p> <p>94 % <i>Mycoplasma gallisepticum</i> str. F, complete genome CP001873.1</p> <p>94 % <i>Mycoplasma gallisepticum</i> str. R(high), complete genome CP001872.1</p>
	T454T	<p>Región intergénica (ISR)</p> <p>CCGGAAGTCGGTTTATAAGAACTGCCTAAGGCAGGACTGGTACTGGGGTTAA GTCGTAACAAGGTATCCCTACGAGAACGTGGGGTGGATTACCTCTTTCTACGG AGTACAAAACAGTCTATTAATAGACTTTTAAACCAAACCTACTAGACTGTACAAA CATTTTGTGTCATGTACTTTTATGGTCGGAGTCTTATCTAGTTTGGAGGACA AAACTTCTCAATGTTCTTTGAAAACGTAATAGTAAATATTTTCGATATTTACAAC GACATCAACAAATAAATTAATTTGGTTAATTTGGTTTGGATTCATCGAGTAATCATT ATTATGATTCATTGAAATGCTTAAATACACATCTTAAAAACATAAACAATAG GAAAATACTACTTT</p>	<p>94 % <i>Mycoplasma felifaucium</i> strain PU AY779746.1</p> <p>92% <i>Mycoplasma</i> sp. Sp22 16S rRNA gene (partial) FN394056.1</p> <p>90 % <i>Mycoplasma adleri</i> AY770622.1</p>
<i>Ciconia ciconia</i>	T452T	<p>Región intergénica (ISR)</p> <p>TACACACCGCCCGTACACCATGGGAGCTGGTAATGCCCAAGTCGGTTAGTCA ACTACGGAGACAACCTGCTAAGGCAGGACTGGTACTGGGGTGAAGTCGTAACA AGGTATCCCTACGAGAACGTGGGGATGGATTACCTCTTCTACGGAGTACACATA AAACAATTTTATTGTTACTTAATACCTATTTTAAATAAATTTAGTCATGGGATAT ATCTAGTTTTGAGAGAATTTCTCTATGTTCTTTGAAAACGTAATAGTAAAGATA TTAATAACAACGACATCAAAAATAAATAGTCAATTTGTTTGTGATACCGAG ATTATTGAAAATAAATTCGTTAAATGCTTTGAAATACATCAACAATAGGAAAA TATTGTTACAACCTTTTAAATAAGTAAAGTGTGGTGGATGCCTGGGTCTGAAA GTCGATGAAGGAC</p>	<p>92 % <i>Mycoplasma</i> sp. 1449. FM196533.1</p> <p>92% <i>Mycoplasma</i> sp. Sgv1a. GQ150562.1</p> <p>91 % <i>Mycoplasma</i> sp. Sgv1b. GQ150563.1</p> <p>89% <i>Mycoplasma verecundum</i>. AY781781.1</p>
	T453 CO	<p>Región intergénica (ISR)</p> <p>GGTTTGCTAACCTCGGAGGCGACCGCCTAAGGTAGGACTGGTACTGGGGTGAA GTCGTAACAAGGTATCCCTACGAGAACGTGGGGTGGATCACCTCTTTCTACGG AGTACACTAGTTATGGAACGAATATTTGATCCAGTTTTGAGAGATTTATCTCTCT TCTGTTCTTTGAAAACGTAATATCGACATTGATATATAAATAAATTTCAAAGT TTAGATCAACCTATAGAATATTTATAAAAAAAGACAACAATAGGTATACAACA ACAAAATAAACGAACAACACTATAAACAGATAAGAGTTT</p>	<p>93 % <i>Mycoplasma spumans</i> AF538684.1</p> <p>93% <i>Mycoplasma spumans</i>. AY762642.1</p> <p>87 % <i>Mycoplasma phocidae</i> GU905028.1</p>
<i>Ciconia nigra</i>	T495 CO	<p>Región intergénica (ISR)</p> <p>GGAGCTGGTAATGCCGAAAGTCGGTTTATAAGAACTGCCTAAGGCAGGACTG GTGACTGGGGTTAAGTCGTAACAAGGTATCCCTACGAGAACGTGGGGTGGATTA CCTCCTTTCTACGGAGTACAACAGTCTTTTAAAGACTTTTTAACCAAACCTACT AGACCTGTACAAATATATTTATGTCATGTACTTTTATGGTCGAAGTCTTATATCT AGTTTTGAGAGGACAAAACCTCTCAATGTTCTTTGAAAACGTAATAGTAAATAT TTTTCGATATTTACAACGACATCAAAAATAAATTAATTTGGTTAATTTGTTTTG ATTCATCGAGTAATCATTTAATATGATTCATTGAAATGCTTAAAATACACATCTA AAAACATAAACAATAGGAAAATACTACTTTTAAATAAGGAAGAGTTTGTGGTGA TGCTTGGGTCTG</p>	<p>91 % <i>Mycoplasma felifaucium</i> strain PU AY779746.1</p> <p>88% <i>Mycoplasma</i> sp. Sp22 16S rRNA gene (partial), ITS1 and 23S rRNA gene (partial), strain Sp22 FN394056.1</p>
<i>Circaetus gallicus</i>	T457 CO	<p>Región intergénica (ISR)</p> <p>GTTTGCTAACCTCGGAGGCGACCGCCTAAGGTAGGACTGGTACTGGGGTGAAG TCGTAACAAGGTATCCCTACGAGAACGTGGGGTGGATCACCTCTTTCTACGGA GTACACACTCTGTTATGAAAAAATTTTGTATCCAGTTTTGAGAGATTTATCTCT CTTTGTTCTTTGAAAACGTAATATCGACATTGAAAAATAAATTAATATTTCA AAGTTTAGATCAACCTATAGAATACAAAATAGACAACAATAGGTATACAACAATA AAAAATAACAACAACACTATAAACAGATAAGAG</p>	<p>94 % <i>Mycoplasma</i> sp. Sgv2c GQ150566.1</p> <p>93 % <i>Mycoplasma</i> sp. Sgv2a GQ150564.1</p> <p>91 % <i>Mycoplasma falconis</i> 16S-23S intergenic spacer, type strain H/T1TAJ780990.1</p> <p>90% <i>Mycoplasma falconis</i> ATCC 51372. AY766087.1</p>

	<p style="text-align: center;">Región intergénica (ISR)</p> <p>T286T CCTCCTTCTACGGAGTACAACGACTATCTATCATATAGTCATCTTATACCAGACTATTTATATCAA ATATTGTATTAATGTTATGACTATGTAAATGTCATAGATATCTAGTTTGAGAGAACTTCT CTCATTGTTCTTGAAACTGAATAGTAAAGATATTACAACGACATCAATAAATAAATTTGG TTAATTTGTTTGAATGATACCGGTAATATTACAATGTAATAATTTATTGAAATGCTTTGAAATATA CATCAACAATAGGTTTATCTAAATTAACCTTTT</p>	<p>92% <i>Mycoplasma buteonis</i> strain Bb/T2g DQ847424.1</p> <p>91 % <i>Mycoplasma buteonis</i> 16S-23S intergenic spacer, type strain BbT2gT AJ780984.1</p>
<p>Falco tinnunculus</p>	<p style="text-align: center;">Gen ARN Ribosómico 16 S</p> <p>T90T TGGCTCAGGATGAACGCTGGCTGTGTCCTAATACATGTCGAGCGGGGTTCCCTCGGGAACC TAGCGCGAATGGGTGAGTAACAGCTGCTTAATCTGCCTTAGATTGGAATACCAAATGGAACA TTTGCTAATGCCGGATACGCATGGAACCGCATGGTCCGTTGTGAAAGGAGCCTTAAAGCTCCGCT AAGAGATGAGGGTGCAGCAATTAGTTAGTTGGTGGTAAATGGCTCAACGACTAGTATGTTTA GCCGGTGCAGAGACTGAACGGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCAACTCTACGGGAGGCA GCAGTAGGGAATTTCCACAATGGCGAAAGCTGATGGAGCGACACAGCTGCACGATGAAGGT CTTCGGATTGAAAGTCTGTTAAGGGAAGAACCTTCAAGTAGGAAATGACTTGAAGCTGACG GTACCTTGTGAGAAAGCGATGGCTAATGTGCCAGCGCCGGTAAATACATAGTCTGCAAGCG TTATCCGGAATTTGGGCGTAAAGCGTTCGTAGGCTGTTTAAAGTCTGGAGTCAATCCAGGG CTCAACCTGGCTCGCTTGGATACTGGTAACTAGAGTTGGATAGAGTAAAGCGAAATCCATGTG AAGCGGTGAAATGCGTAGATATGGAAGAACAACAAAGCGAAGCGACTTACTGGGCTACTACT GACGCTGAGGACGAAAGCTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTGTCCACCGCTGAAA CGATGATCATTAGTGGTGAACGTTCACTGACGACGCTAACGCTTAAATGATCCGCTGAGTAG TATGCTCGCAAGAGTGAATAAAGGAATTGACGGGGACCCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGT TTAATTTGAAGATACACGGAGAACCTTACCCACTCTGACATCTCTGCAAAAGCTATAGAGATATA GGAGGTTAACAGATGACAGATGGTGGTGGTGTGCTGACGCTGCTGCTGAGATGTTGGTTAA GTCTCGCAACGAGCGCAACCCCTATCTTAGTTACTAAGAGTAAAGTGGAGGACTCTAGAGATACT GCCTGGTAACCTGGGGAAGCGGGGATGACGCTCAAATCATCATGCTTACAGGTGGGGCAA CACACGTGCTCAATGTCGGTCAAGGAGAAGCAATATGGCAGATGGAGCAAACTCAAAAAGC CGATCTCAGTTCGGATTGGAGTCTGCAATTCGACTCCATGAAGTGGAAATCGCTAGTAATCGCAGAT CAGCTATGCTCGCGTGAATACGTTCTCGGGTCTGTACACACCCGCCCTCACACCATGGGAGCTGGT AATACCAAAGTGGTTGCTAACCTCGGAGGCGACCCCTAAGGTAGGACTGGTGACTG</p> <p style="text-align: center;">Región intergénica (ISR)</p> <p>T90T TCGCAGGTTTGCAGCTTTCATCGACTCCAGACCCAAGGCAATCCACAAAACCTTATCTGTTT AATAGTTGTTTTGATGTTTGTGATGACCTATTGTCTATATTTTTGATTTCTATAGGTTGATCT AAACTTTGAAATTAATAATAATTTTTCAATGCTGATATTCAGTTTTCAAAGAACAAAAGAGAGT TAGTACTCTCAAACTGGATACAAATATTATCCATAACAGAAAGTTGACTCCGTGAGAAAGGAGGTG ATCCATCCCACTGCTCGTAGGGATACCTTTGACGACTTACCCAGTCCACAGTCTACCTTAGG CGGTGCTCCGAGGTTAGCAAAACGACTTTGGGATTACCACTCCATGGTGTGACGGGCGGTG TGTACAA</p>	<p>100 % <i>Mycoplasma sp. M221-9</i> clone 2 EU684059.1</p> <p>99 % <i>Mycoplasma falconis</i> strain H/T1 NR_024984.1</p> <p>97 % <i>Mycoplasma sp. G.A.</i> partial 16S rRNA gene, strain G.A FR682077.1</p> <p>96 % <i>Mycoplasma spumans</i> 16S ribosomal RNA gene AF538684.1</p>
	<p style="text-align: center;">Gen ARN Ribosómico 16 S</p> <p>T91T TGGCTCAGGATGAACGCTGGCTGTGTCCTAATACATGTCGAGCGGGGTTCCCTCGGGAACC TAGCGCGAATGGGTGAGTAACAGCTGCTTAATCTGCCTTAGATTGGAATACCAAATGGAACA TTTGCTAATGCCGGATACGCATGGAACCGCATGGTCCGTTGTGAAAGGAGCCTTAAAGCTCCGCT AAGAGATGAGGGTGCAGCAATTAGTTAGTTGGTGGTAAATGGCTCAACGACTAGTATGTTTA GCCGGTGCAGAGACTGAACGGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCAACTCTACGGGAGGCA GCAGTAGGGAATTTCCACAATGGCGAAAGCTGATGGAGCGACACAGCTGCACGATGAAGGT CTTCGGATTGAAAGTCTGTTAAGGGAAGAACCTTCAAGTAGGAAATGACTTGAAGCTGACG GTACCTTGTGAGAAAGCGATGGCTAATGTGCCAGCGCCGGTAAATACATAGTCTGCAAGCG TTATCCGGAATTTGGGCGTAAAGCGTTCGTAGGCTGTTTAAAGTCTGGAGTCAATCCAGGG CTCAACCTGGCTCGCTTGGATACTGGTAACTAGAGTTGGATAGAGTAAAGCGAAATCCATGTG AAGCGGTGAAATGCGTAGATATGGAAGAACAACAAAGCGAAGCGACTTACTGGGCTACTACT GACGCTGAGGACGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTGTCCACCGCTGAAA CGATGATCATTAGTGGTGAACGTTCACTGACGACGCTAACGCTTAAATGATCCGCTGAGTAG TATGCTCGCAAGAGTGAATAAAGGAATTGACGGGGACCCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGT TTAATTTGAAGATACACGGAGAACCTTACCCACTCTGACATCTCTGCAAAAGCTATAGAGATATA GGAGGTTAACAGATGACAGATGGTGGTGGTGTGCTGACGCTGCTGCTGAGATGTTGGTTAA GTCTCGCAACGAGCGCAACCCCTATCTTAGTTACTAAGAGTAAAGTGGAGGACTCTAGAGATACT GCCTGGTAACCTGGGGAAGCGGGGATGACGCTCAAATCATCATGCTTACAGGTGGGGCAA CACACGTGCTCAATGTCGGTCAAGGAGAAGCAATATGGCAGATGGAGCAAACTCAAAAAGC CGATCTCAGTTCGGATTGGAGTCTGCAATTCGACTCCATGAAGTGGAAATCGCTAGTAATCGCAGAT CAGCTATGCTCGCGTGAATACGTTCTCGGGTCTGTACACACCCGCCCTCACACCATGGGAGCTGGT AATACCAAAGTGGTTGCTAACCTCGGAGGCGACCCCTAAGGTAGGACTGGTGACTG</p> <p style="text-align: center;">Región intergénica (ISR)</p> <p>T91T TCGCAGGTTTGCAGCTTTCATCGACTCCAGACCCAAGGCAATCCACAAAACCTTATCTGTTT AATAGTTGTTTTGATGTTTGTGATGACCTATTGTCTATATTTTTGATTTCTATAGGTTGATCT AAACTTTGAAATTAATAATAATTTTTCAATGCTGATATTCAGTTTTCAAAGAACAAAAGAGAGT TAGTACTCTCAAACTGGATACAAATATTATCCATAACAGAAAGTTGACTCCGTGAGAAAGGAGGTG ATCCATCCCACTGCTCGTAGGGATACCTTTGACGACTTACCCAGTCCACAGTCTACCTTAGG CGGTGCTCCGAGGTTAGCAAAACGACTTTGGGATTACCACTCCATGGTGTGACGGGCGGTG TGTACAA</p>	<p>100 % <i>Mycoplasma sp. M221-9</i> clone 2 EU684059.1</p> <p>99 % <i>Mycoplasma falconis</i> strain H/T1 NR_024984.1</p> <p>97 % <i>Mycoplasma sp. G.A.</i> partial 16S rRNA gene, strain G.A FR682077.1</p> <p>96 % <i>Mycoplasma spumans</i> 16S ribosomal RNA gene AF538684.1</p>

T109T	<p>Gen ARN Ribosómico 16 S</p> <p>TGGCTCAGGATGAACGCTGGCTGTGTGCTAATACATGCTGATGCGAGCGGGTCCCTCGGGAAACC TAGCGGGAATGGGTGAGTAACACGCTTAATCTGCCCTTAGATTGGAATACCAATGGAACA TTTGTAATGCGGGATACGATGGAACCGCATGGTCCGTGTGAAAGGACCTTTAAAGTCCGCT AAGAGATGAGGGTGGGAACATTAGTTAGTTGGTAGGGTAATGGCTACCAAGACTATGATGTTTA GCCGGTGCAGAGACTGAACGCCACATTGGGACTGAGATACGCCCAAACTCTACCGGAGGCA CGAGTGGGAATATCCAAATGGGGAAAGCTGATGAGCGACACAGCGTGCAGATGAAGT CTTCGGATTGAAAGTGTGTTATAAGGGAAGAACCTTCAAGTAGGAAATGACTTGAAGTGAAGC GATCCCTGTGAGAAAGGATGGCTAACTATGTGCCAGCAGCGCGTAATAACATAGTTCGCAAGCG TTATCCGAAATTTGGCGTAAAGCGTTCGATGGCTGTTTAAATGCTGGAGTCAAAATCCAGG CTCAACCTGGTCCCTTGGTACTGTAACTAGAATGGATTGGATGAGGGTAAGCGGAATCCATGTG AAGCGGTGAATGCTAGATATATGGAAGAACCACAAAGCGAAGCGCACTTACTGGTCTATACT GACGCTGAGGACGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGATTAGATACCTGTTGATCCAGCCGTA CGATGATCATTAGTGGTGAAGCTTCACTGACGCACTAACCCATTAAATGATCCCTGAGTATG TATGCTGCAAGAGTGAACCTTAAAGGAATTGACGGGACCCGACACAAAGCGGTGGAGCATGTG TTAATTGAAGATACACGGAAACCTTACCCTCTTGCATCTTCTGCAAGCTATAGAGATATAGT GGAGTTAACAAGATGACAGATGGTGCATGGTGTGCTGACGCTGCTGCTGAGATGTTGGTAA GTCTGCAACGAGCGCAACCCTATCTTAACTAACGATTAAGTCGAGGACTTAGAGATACT GCCTGGTAACTGGGAGGAAGCGGGGATGACCTCAAAATCATCATGCTCTTACGAGTGGGCA CACACGTGCTACAATGGTCCGTACAAAGAGAACAATATGGCGCATGGAGCAAAATCAAAAAGC CGATCTCAGTTCGGATTGAGTCTGCAATGCTCACTCAATGAAGTGGAAATCGCTAGTAAATCGAGAT CAGCTATGTCGGGTGAATACGTTCTCGGTTCTGTACACACCCCGCTCACACATGGGAGCTGGT AATACCAAGTCGGTTGCTAACTCGGAGCGACGCGCTAAGTAGGACTGGTACTG</p>	<p>100 % <i>Mycoplasma sp. M221-9</i> clone 2 EU684059.1</p> <p>99 % <i>Mycoplasma falconis</i> strain H/T1 NR_024984.1</p> <p>97 % <i>Mycoplasma sp. G.A.</i> partial 16S rRNA gene, strain G.A FR682077.1</p> <p>96 % <i>Mycoplasma spumans</i> 16S ribosomal RNA gene AF538684.1</p>
T88C	<p>Gen ARN Ribosómico 16 S</p> <p>CTTGCTTCAGTCGAGCGGATCTTCGGACTTAGCGCGATGGGTGAGTAACACGTAACCTAAACGTC CCCTAGATTGGAAATACGCTGAGAAATAGCGCTAATGCCGATACCTATTAGTTCCGATGAAA TTAATATAAAGGAGCGTTTCTTCACTAGAGATCGGGGTGGCGTAACATTAGCTAGTTGTAAG TAATGCTTACCAAGCGGATGATGTTTACGGGGTGGAGAGACTGCCGCCACTGGGACTGAG ATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGACAGCATAGGGAATTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGG AGCGACACAGCGTGCAGGATGAAGGCTTCCGGTGTAAACTGCTGTTATAAGGGAAGAAAAAAC AGAGGAGGAAATGCCCTTCTTGAACGGTACCTTGCAGAAAGCAACGGCTAACTATGTGCCAGCA GCCGCGTAATACATAGTTCGCAAGCGTATCCGGAATATTGGGCGTAAAGCGTCTGATGAGTGT GTGTTAAGTCTGACGTAATAAAGCTGGGGCTCAACCCAAATAGCGTTGGATCTGCAACGCTAGAA TTGTTAGAGGTTAGCGGAATCCTAGTGAAGCGGTGAAATGCTGATAGATTAGGAAGAACAACAA CATGGCAAGGCACTAATCGGCAATATTGACACTGAGAGAGCAAAAGCGTGGGAGCAAAACAG GATTAGATACCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGATGATTAGCTGATGGGAACCTCGGCGCAG CTAACGCATTAATCATCCGCTGAGTATGACGCAAGTGTGAAACTTAAAGGAATGACGGG GATCCGCAACAGCGGTGGAGCATGTGTTAATTTGAAGATACGCGTAGAACCTTACCCTCTTGA CATCTCCGCAAGCTATAGAGATATAGTGGAGGCTACCGGAATGACAGATGGTGCATGTTGTG TCAGCTGCTGCTGATGATGTTGCGTTAAGTCTGCAACGAGCGCAACCTTCTTCTTATGATGATG ATCTAAGGAGACTGCCGAGTAATCCGGAGGAAGTGGGAGCAGCTCAAAATCATCATGCTCTTA CGAGTGGGCAACACACGCTGCTCAATGACGCTGCAAAAGAGAAGCAAGCAGCGATGTGGAGCA AATCTCAAAAACCGTCTCAGTTCGGATTGATGATGCTGCAACTGCACTACATGAAGTGGAAATCGCT AGTAATCGTAGATCAGCTACGCTACGGTGAATACGTTCTCGGTTCTGTACACACCCCGCTCACAC CATGGGAGCTGTAATGCCAAAGTCGGTTTTGTAACACGAGACAACCTGCTAAGCGAGGACT</p>	<p>99 % <i>Mycoplasma sp. M200-2</i> EU684060.1</p> <p>99 % <i>Mycoplasma sp. M26</i> EU660528.1</p> <p>99 % <i>Mycoplasma sp. M209-7</i> clone 2 EU684061.1</p> <p>98 % <i>Mycoplasma buteonis</i> strain Bbt2gNR_025177.1</p>
T88T	<p>Gen ARN Ribosómico 16 S</p> <p>CTTGCTTCAGTCGAGCGGATCTTCGGACTTAGCGCGATGGGTGAGTAACACGTAACCTAAACGTC CCCTAGATTGGAAATACGCTGAGAAATAGCGCTAATGCCGATACCTATTAGTTCCGATGAAA TTAATATAAAGGAGCGTTTCTTCACTAGAGATCGGGGTGGCGTAACATTAGCTAGTTGTAAG TAATGCTTACCAAGCGGATGATGTTTACGGGGTGGAGAGACTGCCGCCACTGGGACTGAG ATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGACAGCATAGGGAATTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGG AGCGACACAGCGTGCAGGATGAAGGCTTCCGGTGTAAACTGCTGTTATAAGGGAAGAAAAAAC AGAGGAGGAAATGCCCTTCTTGAACGGTACCTTGCAGAAAGCAACGGCTAACTATGTGCCAGCA GCCGCGTAATACATAGTTCGCAAGCGTATCCGGAATATTGGGCGTAAAGCGTCTGATGAGTGT GTGTTAAGTCTGACGTAATAAAGCTGGGGCTCAACCCAAATAGCGTTGGATCTGCAACGCTAGAA TTGTTAGAGGTTAGCGGAATCCTAGTGAAGCGGTGAAATGCTGATAGATTAGGAAGAACAACAA CATGGCAAGGCACTAATCGGCAATATTGACACTGAGAGAGCAAAAGCGTGGGAGCAAAACAG GATTAGATACCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGATGATTAGCTGATGGGAACCTCGGCGCAG CTAACGCATTAATCATCCGCTGAGTATGACGCAAGTGTGAAACTTAAAGGAATGACGGG GATCCGCAACAGCGGTGGAGCATGTGTTAATTTGAAGATACGCGTAGAACCTTACCCTCTTGA CATCTCCGCAAGCTATAGAGATATAGTGGAGGCTACCGGAATGACAGATGGTGCATGTTGTG TCAGCTGCTGCTGATGATGTTGCGTTAAGTCTGCAACGAGCGCAACCTTCTTCTTATGATGATG ATCTAAGGAGACTGCCGAGTAATCCGGAGGAAGTGGGAGCAGCTCAAAATCATCATGCTCTTA CGAGTGGGCAACACACGCTGCTCAATGACGCTGCAAAAGAGAAGCAAGCAGCGATGTGGAGCA AATCTCAAAAACCGTCTCAGTTCGGATTGATGATGCTGCAACTGCACTACATGAAGTGGAAATCGCT AGTAATCGTAGATCAGCTACGCTACGGTGAATACGTTCTCGGTTCTGTACACACCCCGCTCACAC CATGGGAGCTGTAATGCCAAAGTCGGTTTTGTAACACGAGACAACCTGCTAAGCGAGGACT</p>	<p>99 % <i>Mycoplasma sp. M200-2</i> EU684060.1</p> <p>99 % <i>Mycoplasma sp. M26</i> EU660528.1</p> <p>99 % <i>Mycoplasma sp. M209-7</i> clone 2 EU684061.1</p> <p>98 % <i>Mycoplasma buteonis</i> strain Bbt2g NR_025177.1</p>

<p>T200T</p>	<p>Gen ARN Ribosómico 16 S</p> <p>CTTGCTTCTCAGTCGAGCGGATTCTCGGACTTAGCGGCGATGGGTGAGTAACACGTAACCTG CCCTCTAGATTGGAATAACGCTGAGAAATAGCGCTAATGCCGATACTATTAGTTTCGCATGAAA TTAATATAAAAGGAGCGTTTGCTTCACTAGAGGATCGGGGTGCGTAACATTAGCTAGTTGGTAAGG TAATGGCTTACCAAGCGATGATGTTTAGCGGGTTGAGAGACTGATCCGCCACACTGGGACTGAG ATACGGCCAGACTCTACGGGAGGCGAGTAGGGAAATTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGG AGCGACACAGCGTGCAGGATGAAGCCTTCGGGTTGAACTGCTTTATAAGGGGAAGAAAAAC AGAGGAGGAAATGCCTTTGCTTACGGTACCTTTCAGAAAGCAACGGCTAACTATGTCACGCA GCCCGGTAATACATAGGTTGCAAGCGTTATCCGGAATATTGGGCGTAAAGCGTCTGAGGTTGT GTGTTAAGTCTGACGTAATAAAGCTTGGGGCTCAACCCCAAATAGCGTTGGATCTGGCACGCTAGAA TTGTGTAGAGGTTAGCGGAATTCCTAGTGAAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAAGAACATCAA CATGGCGAAGGAGCACTAAGTGGCACATATTGACACTGAGAGACGAAAGCGTGGGAGCAAAACAG GATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATGATTAGCTGATGGGAACCATCGGCGCAG CTAACGCATTAAATCATCCGCTGAGTAGTACGACGAAAGTGTGAACTAAAGGAATGACGGG GATCCGCCAAGCGGTGAGCTGTGGTTAATTTGAAGATACGCGTAGAACCTTACCACTCTTGA CATCTCCGCAAGCTATAGAGATATAGTGGAGGCTAACGGAATGACAGATGGTGATGTTGCTG TCAGCTCGTGTGAGATGTTGCTTAACTGCTCAACGAGCGCAACCTTGCCTTAGTTAGATG ATCTAAGGAGACTGCCGGAATATCCGAGGAAAGTGGGAGCGACGCTCAAATCATCATGCCTCTTA CGAGTGGGCAACACAGCTCAATGACGCTCAAAAGAGAAAGCAAGACAGCGATGGGAGCA AATCTCAAAAAACCGTTCTCAGTTCCGATTGATGTTGCAACTCGACTACATGAAAGTCCGAAATCGCT AGTAATCGTAGATCAGCTACGCTACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTGTACACACCGCCCTCACAC CATGGGAGCTGTAATGCCAAAGTCGGTTTTGTAACACGAGGACAACCTGCTAAGGCAGGACT GGTGA</p>	<p>99 % <i>Mycoplasma sp. M200-2</i> EU684060.1</p> <p>99 % <i>Mycoplasma sp. M26</i> EU660528.1</p> <p>99 % <i>Mycoplasma sp. M209-7</i> clone 2 EU684061.1</p> <p>98 % <i>Mycoplasma buteonis</i> strain BbT2gNR_025177.1</p>
<p>T95T</p>	<p>Gen ARN Ribosómico 16 S</p> <p>CTTGCTTCTCAGTCGAGCGGATTCTCGGACTTAGCGGCGATGGGTGAGTAACACGTAACCTG CCCTCTAGATTGGAATAACGCTGAGAAATAGCGCTAATGCCGATACTATTAGTTTCGCATGAAA TTAATATAAAAGGAGCGTTTGCTTCACTAGAGGATCGGGGTGCGTAACATTAGCTAGTTGGTAAGG TAATGGCTTACCAAGCGATGATGTTTAGCGGGTTGAGAGACTGATCCGCCACACTGGGACTGAG ATACGGCCAGACTCTACGGGAGGCGAGTAGGGAAATTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGG AGCGACACAGCGTGCAGGATGAAGCCTTCGGGTTGAACTGCTTTATAAGGGGAAGAAAAAC AGAGGAGGAAATGCCTTTGCTTACGGTACCTTTCAGAAAGCAACGGCTAACTATGTCACGCA GCCCGGTAATACATAGGTTGCAAGCGTTATCCGGAATATTGGGCGTAAAGCGTCTGAGGTTGT GTGTTAAGTCTGACGTAATAAAGCTTGGGGCTCAACCCCAAATAGCGTTGGATCTGGCACGCTAGAA TTGTGTAGAGGTTAGCGGAATTCCTAGTGAAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAAGAACATCAA CATGGCGAAGGAGCACTAAGTGGCACATATTGACACTGAGAGACGAAAGCGTGGGAGCAAAACAG GATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATGATTAGCTGATGGGAACCATCGGCGCAG CTAACGCATTAAATCATCCGCTGAGTAGTACGACGAAAGTGTGAACTAAAGGAATGACGGG GATCCGCCAAGCGGTGAGCTGTGGTTAATTTGAAGATACGCGTAGAACCTTACCACTCTTGA CATCTTCCGCAAGCTATAGAGATATAGTGGAGGCTAACGGAATGACAGATGGTGATGTTGCTG TCAGCTCGTGTGAGATGTTGCTTAACTGCTCAACGAGCGCAACCTTGCCTTAGTTAGATG ATCTAAGGAGACTGCCGGAATATCCGAGGAAAGTGGGAGCGACGCTCAAATCATCATGCCTCTTA CGAGTGGGCAACACAGCTCAATGACGCTCAAAAGAGAAAGCAAGACAGCGATGGGAGCA AATCTCAAAAAACCGTTCTCAGTTCCGATTGATGTTGCAACTCGACTACATGAAAGTCCGAAATCGCT AGTAATCGTAGATCAGCTACGCTACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTGTACACACCGCCCTCACAC CATGGGAGCTGTAATGCCAAAGTCGGTTTTGTAACACGAGGACAACCTGCTAAGGCAGGACT GGTGA</p>	<p>99 % <i>Mycoplasma sp. M200-2</i> EU684060.1</p> <p>99 % <i>Mycoplasma sp. M26</i> EU660528.1</p> <p>99 % <i>Mycoplasma sp. M209-7</i> clone 2 EU684061.1</p> <p>98 % <i>Mycoplasma buteonis</i> strain BbT2gNR_025177.1</p>
<p>T72T</p>	<p>Gen ARN Ribosómico 16 S</p> <p>CTTGCTTCTCAGTCGAGCGGATTCTCGGACTTAGCGGCGATGGGTGAGTAACACGTAACCTG CCCTCTAGATTGGAATAACGCTGAGAAATAGCGCTAATGCCGATACTATTAGTTTCGCATGAAA TTAATATAAAAGGAGCGTTTGCTTCACTAGAGGATCGGGGTGCGTAACATTAGCTAGTTGGTAAGG TAATGGCTTACCAAGCGATGATGTTTAGCGGGTTGAGAGACTGATCCGCCACACTGGGACTGAG ATACGGCCAGACTCTACGGGAGGCGAGTAGGGAAATTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGG AGCGACACAGCGTGCAGGATGAAGCCTTCGGGTTGAACTGCTTTATAAGGGGAAGAAAAAC AGAGGAGGAAATGCCTTTGCTTACGGTACCTTTCAGAAAGCAACGGCTAACTATGTCACGCA GCCCGGTAATACATAGGTTGCAAGCGTTATCCGGAATATTGGGCGTAAAGCGTCTGAGGTTGT GTGTTAAGTCTGACGTAATAAAGCTTGGGGCTCAACCCCAAATAGCGTTGGATCTGGCACGCTAGAA TTGTGTAGAGGTTAGCGGAATTCCTAGTGAAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAAGAACATCAA CATGGCGAAGGAGCACTAAGTGGCACATATTGACACTGAGAGACGAAAGCGTGGGAGCAAAACAG GATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATGATTAGCTGATGGGAACCATCGGCGCAG CTAACGCATTAAATCATCCGCTGAGTAGTACGACGAAAGTGTGAACTAAAGGAATGACGGG GATCCGCCAAGCGGTGAGCTGTGGTTAATTTGAAGATACGCGTAGAACCTTACCACTCTTGA CATCTTCCGCAAGCTATAGAGATATAGTGGAGGCTAACGGAATGACAGATGGTGATGTTGCTG TCAGCTCGTGTGAGATGTTGCTTAACTGCTCAACGAGCGCAACCTTGCCTTAGTTAGATG ATCTAAGGAGACTGCCGGAATATCCGAGGAAAGTGGGAGCGACGCTCAAATCATCATGCCTCTTA CGAGTGGGCAACACAGCTCAATGACGCTCAAAAGAGAAAGCAAGACAGCGATGGGAGCA AATCTCAAAAAACCGTTCTCAGTTCCGATTGATGTTGCAACTCGACTACATGAAAGTCCGAAATCGCT AGTAATCGTAGATCAGCTACGCTACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTGTACACACCGCCCTCACAC CATGGGAGCTGTAATGCCAAAGTCGGTTTTGTAACACGAGGACAACCTGCTAAGGCAGGACT GGTGA</p>	<p>99 % <i>Mycoplasma sp. M200-2</i> EU684060.1</p> <p>99 % <i>Mycoplasma sp. M26</i> EU660528.1</p> <p>99 % <i>Mycoplasma sp. M209-7</i> clone 2 EU684061.1</p> <p>98 % <i>Mycoplasma buteonis</i> strain BbT2gNR_025177.1</p>
<p>T159T</p>	<p>Gen ARN Ribosómico 16 S</p> <p>TGAGAGTTTGGACCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCTGTGCTAATACATCATGTCGAGCGGA GTTCTTCGAACTAGCGGCGAATGGGTGAGTAACACGTAACCTTAACTAGTTGGGATAA CGGTGAGAAATCACCGCTAATACCGGATCACTAAGGAAGCGATCTTCTTATAAAAGGAGCGCT CAAACTCCACTAGGAGATCGGGGTGCGGAACATTAGTTAGTTGGTAGGTAATGGCTACCAAGA CTATGATGTTTAAAGCGGTTGAGAGACTGATCCGTCACACTGGGACTGAGATACGCGCCAGACTCC TACGGGAGGCGAGTAGGGAATTTCCACAATGGGCGAAAGCGTGGGAGCGACACAGCGTGC AGGATGAAGCCTTCGGTTGTAACCTGCTGTTAATGAGATGAAAAAATAGTAGAGGAAATGCTA TTATCTTGACAGTAAATCAGAAAGCAACGGCTAATGTCGCAAGCGCCGCTAATACATAG</p>	<p>99 % <i>Mycoplasma sp. M222-5</i> clone 1 EU684058.1</p> <p>99 % <i>Mycoplasma sp. SF9</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. EU544228.1</p>

	<p>GTTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGCGTAAAGCGTCTGTAGTGTGTTGTTAAGTCTGGCGTCA AAACTGGGGCTCAACCCCAATCGCGTGGATACTGACAACTAGAATTGTGAGAGGTTAACGG AATTCCTGTGAAGCGGTGAATCGTAGATATAAGGAAGCACTCACTGGCGAAGCGAGTTAA CTGGGCACATATTGACACTGAGAGACGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTAG TCCACGCGTAAACGATGATGATTAGCTGATGGAACCACTCGGCAGCTAACGATTAATCATCC GCCTGAGTAGTCTGCAAGAGTGAACCTTAAAGGAATTGACGGGGATCCGCAACAGCGTGG AGCATGTGGTTAATTGAAGATACCGCTAGAACCCTACCACTCTTGACATCTTGCACAAAGCTATA GAGATATAGTGGAGTTAACAAGATGACAGATGGTGTGATGTTGTCGACGCTGCTGCTGAGAT GTTGCTTAAAGTCTGCAACGAGCGCAACCTTGTCTTAAATAATCTTAAAGAACTGCCCGG GTAACCTGGGAGAGTGGGAGCAGCTCAATCATCATGCTTACAGGTGGGGCAACACAG TGCTCAACTGGAGGTCAAGAGGAGGATGGGACATGACGACATGAGCAAACTCAAAAACCGTCTT CAGTTCGGATTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGTGGAACTCGTAGTAATCGTAGATCAGCTA CGTACGCTGAATACGTTCTGGGCTTGTACACACCCCGCTCACCACTGGAGCTGTAATGCC CGAAGTCGGTTAGTCAACTACGGAGCAACTGCTAAGCGAGACTGGGACTGGGTGAAATGC GTAACAAGGTATCCCTACGAGAACGTGGG</p> <p style="text-align: center;">Región intergénica (ISR)</p> <p>TCTGTACACACCCCGTCAACCATGGGAGCTGTAATGCCGAAGTCGGTTTGTCACTACGG AGACAACCTGCTAAGCGAGGACTGGTACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGATCCCTACGAGAAC GTGGGGATGGATTACCTCTTTCTACGGAGTCAAAAACAATTTTATTGTTACTTTAATTACCTTAT TTATAATTCGCTATGGATATATCTAGTTTGGAGAAATTTCTCTCTATGTTCTTTGAAAACGGAATA GTAAGATATTAATAACAACGACATCAAAAATAAATTAGTCAATTTGTTTTGTATACCGAGATTA TTAGAAATAATAATTCGTTAAATGCTTTGAAATCATCAACAATAGGAAAATTTGTTACAACTTTT AAATAAGTAAGAGTTGTGGTGGATGCCTGGGTCTGAAAGTCGATGAAGGACGCTG</p>	<p>99 % <i>Mycoplasma sp. ARNO</i> EU544230.1</p> <p>99 % <i>Mycoplasma sp. SF12</i> EU544226.1</p> <p>99 % <i>Mycoplasma sp. Z61</i> EU544227.1</p>
<p style="text-align: center;">T101T</p>	<p style="text-align: center;">Gen ARN Ribosómico 16 S</p> <p>TGAGAGTTTGGACCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCTGTGTGCTAATACATGATGTCGAGCGGA GTTCTCGGAACTTAGCGGGAATGGTGGTGAACACGCTACTAACCTACTCTAGATTGGGATAA CGGTGAGAATACCCGTAATACCGGATACTATAAGGAAGGCACTTCTCTATATAAAGGAGCCT CAAGCTCCACTAGGAGATCGGGTGGGGAACATAGTTAGTTGGTGGAGTAATGGCTCACCAAGA CATGATGTTTAAACGGGTTGAGAGACTGATCCGTCACACTGGGACTGAGATACGCCCAAGACTCC TACGGGAGGACGAGTGGGAATTTTCCCAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCGACACAGCGTGC AGGATGAAGGCTTCCGGTTGTAACCTGCTTATTAGGATGAAAAATAGTAGGAAATGCTA TTATCTGACGACTAAATCAGAAGCAACGCTAATATGTCGACGACCGCGGTAATACATAG GTTGCAAGCGTTAATTCGGAATTTGGCGTAAAGCGCTGTAGGTTGTTGTTAAGTCTGGCGTCA AAACTGGGGCTCAACCCCAATCGCTGGTACTGACAACTAGAAATGTTGAGAGGTTAACCG AATTCCTGTGAAGCGGTGAATCGTAGATATAAGGAAGCACTCACTGGCGAAGCGAGTTAA CTGGGCACATATTGACACTGAGAGACGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTGT TCCACGCTGAACGATGATGATTAGCTGATGAAACCTACGCGCAGCTAACGATTAATCATCC GCCTGAGTAGTACTGCAAGAGTGAACCTAAGGAATGACGGGGATCCGCAACAGCGTGG AGCATGTGGTTAATTGAAGATACGCTGAGAACCCTACCACTCTGACATCTTCTCAAAAGCTATA GAGATATAGTGGAGTTAACAAGATGACAGATGGTGTGATGTTGTCGCTGCTGCTGCTGAGAT GTTGCTTAAAGTCTGCAACGAGCGCAACCTTGTCTTAAATAATCTTAAAGAACTGCCCGG GTAACCTGGGAGAGTGGGAGCAGCTCAATCATCATGCTTACGAGTGGGGCAACACAG TGCTCAACTGGAGGTCAAGAGGAGGATGGGACATGAGGCAAACTCAAAAACCGTCTT CAGTTCGGATTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGTAGATCAGCTA CGCTACGCTGAATACGTTCTGGGCTTGTGACACACCCCGCTCACCACTGGGAGCTGTAATGCC CGAAGTCGGTTAGTCAACTACGGAGCAACTGCTAAGCGAGACTGGTGGTGGGTTGAAGTC GTAACAAGGTATCCCTACGAGAACGTGGG</p> <p style="text-align: center;">Región intergénica (ISR)</p> <p>TCTGTACACACCCCGTCAACCATGGGAGCTGTAATGCCGAAGTCGGTTTGTCACTACGG AGACAACCTGCTAAGCGAGGACTGGTACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGATCCCTACGAGAAC GTGGGGATGGATTACCTCTTTCTACGGAGTCAAAAACAATTTTATTGTTACTTTAATTACCTTAT TTATAATTCGCTATGGATATATCTAGTTTGGAGAAATTTCTCTCTATGTTCTTTGAAAACGGAATA GTAAGATATTAATAACAACGACATCAAAAATAAATTAGTCAATTTGTTTTGTATACCGAGATTA TTAGAAATAATAATTCGTTAAATGCTTTGAAATCATCAACAATAGGAAAATTTGTTACAACTTTT AAATAAGTAAGAGTTGTGGTGGATGCCTGGGTCTGAAAGTCGATGAAGGACGCTG</p>	<p>99 % <i>Mycoplasma sp. M222-5</i> clone 1 EU684058.1</p> <p>99 % <i>Mycoplasma sp. SF9 16S</i> ribosomal RNA gene, partial sequence. EU544228.1</p> <p>99 % <i>Mycoplasma sp. ARNO</i> EU544230.1</p> <p>99 % <i>Mycoplasma sp. SF12</i> EU544226.1</p> <p>99 % <i>Mycoplasma sp. Z61</i> EU544227.1</p>
<p style="text-align: center;">T398T</p> <p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Fratercula arctica</p>	<p style="text-align: center;">Gen ARN Ribosómico 16 S</p> <p>TGGCTCAGGATGAACGCTGGCTGTGTGCTAATACATGATGTCGAGCGAGGTTCTCGGAACTCA CGGGCAATGGGTGAGTAACACGCTACTTAACTGCTCCCTCAGATTGGGATAACACTGAGAAATTAG TGCTAATACCGGATACTATAATTATCGCATGATAGATATAATAAAGGAGCTCCTGGCTTCACTGAA GGATCGGGGTGCGTAAATAGCTGTTGGTGAAGTAAACGCTCAACAGGCGATGATTAGTAGCG GGTGTGAGACTACTCGCCACACTGGGACTGAGATCGGCCAGACTCCATCGGAGGCGACGA GTAGGAAATTTTCCCAATGGGGGAAAGCCTGATGGAGCGACACAGCTGCAAGATGACGCGCTT CGGTTGTAACCTGCTTATAAAGGAAGAAAACATAGTGTAGGAAATGACATAGCTTGAAGGTTA CTTATCAGAAGAACGCTAATGCTGTCGACAGCGCGGTAATACATAGTGTGCAAGCTTAT CCGAATATTGGGGTAAAGCTGTGTAGGTTGTGTGTTAAGTCTGCGCTCAAACTCGGGGCTC AACCCGATACCGGTTGGATCTGGCAGCTGAAGATTGTGAGAGTAAAGGCAATTCATGTTGAA CGGTTGAAATGCTGATAGATATGGAAGAACCAACTTGGCGAAGGCGACTTACTGGGCACATATT GACACTGAGAGACGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATGATGATCCCTGGTAGTCCAGCGCTGAA CGATGATGATTAGCTAATGGGAACTTTGGGCGAGCTAACGCAATTAATCCTCCGCTGAGTAGT GCTCGCAAGAGTGAACCTTAAAGGAATTTGACGGGGATCCGCAACAGCGGTTGGAGCATGTTGTTA ATTTGAAGATACGCTGAAACCTTACCACTCTTGACATCTTCCGCAAGCTATAGAGATATAGTGG AGGCTAACGGAAATGACAGATGGTGCATGTTGCTGCTGACGCTGCTGCTGAGATGTTGCTGTTAAGT CCGGCAACGAGCGCAACCTGCTTCTTAAATGTTTACAGGAGACTGCTGGGTAACCAAGGAT GAAGTGGGAGCAGCTCAATCATCATGCTCTTACGAGTGGGGCAACACAGCTGCTCAATGGA CGGTACAAAGAGACGCAAAAACCGGAGCTCAAGCAATCTCAAAAACCGTCTCAGTTCGGATTG TAGTCTGCAACTGACTACATGAAGTCGGAATCGCTAATGCTGATAGTACGCTACGCTACGCTGAA TACGTTCTGGGCTTGTATACACACCGCCGCTCACCACTGGGAGCTGGTAAATGCCGAAGTCGGTT TGTTAACTACGGAGCAACTGCTAAGCGAGGACTGTGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGATC CCTAC</p>	<p>94 % <i>Mycoplasma corogypsi</i> strain BV1 16S NR_025896.1</p> <p>94 % <i>Mycoplasma sp. 1074</i> AM182896.1</p> <p>94 % <i>Mycoplasma sp. 38104</i> FM878637.1</p> <p>93 % <i>Mycoplasma edwardii</i> U73903.1</p>

		<p>Región intergénica (ISR)</p> <p>ACACACCCCGCTCACACCATGGGAGCTGTAATGCCGGAAGTCGGTTTTGTTAACTACGGAGACA ACTGCCTAAGGACGAGCTGGTACTGGGGTAAAGTCGTAACAAAGGTATCCCTACGAGAACGGGG GATGGATCACCTCCTTCTAACGGAGTACAATAATCGTTTTACGATTAACCTTAACAGACTATTT CATTTGATAAAACATTCAACAACCTCATGACGAAGTAAATAGTCTCTGATATATCTAGTTT TGAGAGAAATTTCTCTAAATTTGTTTGGAAACTGAATAGTAATATAGATATTAACAGCATCA AATAATAAATAAATTTGGTAAATTTGTTTGGTATACCGGATTTATAGAAATAAATAATTTATT GAAATGTCTTAAATACACATCAACAATAGGTCATATTGTTACAACCTTTAAATAAGTAAGATTTGTG GTGGATGCCTGGGCTGGAAGTCGATGAAGGA</p>	
<i>Fulmar glaciaris</i>	T192T	<p>Gen ARN Ribosómico 16 S</p> <p>CCCTCGGGCAGCTTAGCGGGAATGGGTGAGTAAACAGCTACTTAATCTACCTTTAGATTGGAATA CCTAATGGAAACATTGGCTAATGCCGATACGCATGAAATCGCATGATTCGTTGTGAAAGAAGCTT TCAAGCTTCACTAAGGATGAGGGTCCGGAACATTAGTTAGTTGGTAGGGTAAAGGCTACCAAGA CTATGATGTTTAGCCGGTGCAGAGACTGAACGGCCATTGGGACTGAGATACGGCCAAACTCC TACGGGAGCAGCAGTAGGGAATATCCCAATGGCGAAAGCCTGATGGAGCGACACAGCTGC ACGATGAAGTCTTTCGGATTGAAAGTCTGTTATAAGGGAAGAATAGCTAGTTGAGGAATGCTT CTAGTTTGACGCTACCTTGTCTGAGAGCGATGGCTAATGTGCCAGCAGCCGGGTAATACATAG GTCCCAAGCTTATCGGAATTTGCGCTAAAGACTCTGAGCGTGTATTAAAGTCTGGAGTCA AACCCGGGGCTCAACCCGGTCTGCTTGGACACTGATAAATAGAGTAAATAGAGGTAAGCGGA ATTCCATGTGAAGCGGTGAAATGCGTATATATGGAAGAACAACCAAGGCGAAGGCACTTACTG GGTTTATCTGACGCTGAGGACGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATAGATACCTGGTATGCC ACGCCGTAACGATGATCATTAGTCTGGTGGAGGAGAATCACTGACGCGACTAACGCATTAATGA TCCGCTGATGATGCTCGCAAGAGTAACTTAAAGGAATGACGGGGCCGCAACAGCGGT GGAGCATGGTTTAAATTTGAAGATAACGGAGAACTTACACTCTTGACATCTTTTGCAGAGCT ATAGAGATATAGTGGAGGTTAAACAAATGACAGATGGTGTATGGTGTCTGCTCAGCTGCTGCTGGA GATGTTTGGTTAAGTCTGCAACGAGCGCAACCCCTATCTTTAGTTACTAACAAAGTAATGTTGAGGA CTCTAGAGATACTGCTGGTAACTGGGAGGAAGCGGGGATGACGCTCAAATCATATGCCTCTTA CGAGTGGGGCCACACGCTGCTCAATGGTCTGTAACAAGAGAAGCAATATGGCAGATGGAGCA AATCTCAAAAAGCCGATCTCAGTTCGATGGAGTCTGCAATTCGACTCATGAAGTCCGAATCGCT AGTAATCGCAGATCAGCTATGCTGGGTGAATAGTCTGCGGCTCTGACACACCGCCGTCACAC CATGGAGCTGGTAATACCAAGTGGTGTAGCTAACCTCGAGGCGACCCGCTAAGGTAGGACTG GTGACTGGGGTGAAGTCTGAACAAGTATCCCTACGAGAAGCTGGGATGGATCACTCCTTCTCA CGGAGTACATCAGCTTATGAATAAAAATTTGATCCAGTTTGGAGAGAATATCTCTCTTTTGTCTT</p> <p style="text-align: center;">T</p> <p>Región intergénica (ISR)</p> <p>GGTTAGCTAACTCGGAGCGCCCTAAGTAGGACTGGTGAAGTGGTGAAGTCTGAACAAG GTATCCCTACGAAACGTGGGATGATCACTCCTTTCTACGGAGTACATCAGTTATGAATAAAA ATTTGATCCAGTTTTGAGAGAAATATCTCTCTTTTCTTTGAAAACCTGAATGACAGATGATAT ATTTTAAATTTCAAAGTTTATGATCAACCTATAGAATTTTATTTTGAACAATAGGTCATACAA ATTACATAACAAAATTTAAACAAGATAAGAGTTTTTGGTGGATGCCTTGGGTCTGGAAGTCGAT AAGGACGTGCAAACTCGCA</p>	<p>95 % <i>Mycoplasma canadense</i> strain 466 EU92558.1</p> <p>94 % <i>Mycoplasma spumans</i> AF538684.1</p> <p>94 % <i>Mycoplasma phocicerebrale</i> strain CSL 5195S2 DQ840513.1</p> <p>94 % <i>Mycoplasma phocidae</i> strain CSL 7498-2 EU827597.1</p>
<i>Gypaetus barbatus</i>	T549T	<p>Región intergénica (ISR)</p> <p>TAAGGTAGGACTGGTACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTATCCCTACGAGAAC GTGGGATGGATCACCTCTTCTACGGAGTACACTAGTTATGGAACGAATATTT GTATCCAGTTTTGAGAGATTTATCTCTCTCTTTTGGAAAACCTGAATATCGACA TTGATATATAAATAAATTTCAAAGTTTATGATCAACCTATAGAATATTTATATA AAAAGACAACAATAGGTCATACAACAACAATAAATAACGAAACAATAAACA AGATAAGAG</p>	<p>95 % <i>Mycoplasma spumans</i> AF538684.1</p> <p>94 % <i>Mycoplasma spumans</i> AY762642.1</p> <p>87 % <i>Mycoplasma phocidae</i> GU905028.1 strain C264-NAS.</p>
<i>Gyps fulvus</i>	T513 CO	<p>Región intergénica (ISR)</p> <p>GACACACCGCCCTCACACCATGGGAGCTGGTAATGCCGGAAGTCGGTTTGTAGTCA ACTACGGAGACAACCTGCCTAAGGACGAGTGGTACTGGGGTGAAGTCTGAACA AGGTATCCCTACGAGAACGTGGGATGGATTACCTCCTTCTACGGAGTACACATA ATAACAATTTATGTTACTTAAATACYTCTTTTATAAAAACAATAATTTGTCTATGG GATATATCTAGTTTTGAGAGAACTTCTCTATGTTCTTTGAAAACCTGAATAGTAA AGATATTAATAACAACGACATCAAAAATAAATAATAGTCAATTTGTTTGTG ATACCGAGAAATTTAGAAATAAATAATCGTTAAAATGCTTTGAAATACATCAAC AACAAATAGGAAAATTTGTTCAACTTTTAAATAAGTAAGTCTTTGTTGGATGTC CTTGGTCTGAAAGTCGATGAAGGACG</p>	<p>99 % <i>Mycoplasma sp. Sgv1a</i> GQ150562.1</p> <p>97 % <i>Mycoplasma sp. 1449</i> FM196533.1</p> <p>94 % <i>Mycoplasma verecundum</i> AY781781.1</p> <p>88 % <i>Mycoplasma cynos</i> strain H- 831DQ847425.1</p>
<i>Hieraetaes fasciatus</i>	T550T	<p>Región intergénica (ISR)</p> <p>CTACRGAGTACAACCTCTGTTATGGAAAAATATTTGATCCAGTTTTGAGAGATTT ATCTCTCTTTTGTCTTTGAAAACCTGAATATCGACATTGAAAATTAATAAATA TTTCAAAGTTTAGATCAACCTATAGAATACAAAATATAGACAACAATAGGTCATAC TACAACAATAAATAACAACAACATTTAAACAAGATAAGAGTTTTGTTGGTGGATG CCTTGGGCTGGAAGTCGATGAAGGAC</p>	<p>92 % <i>Mycoplasma falconis</i> ATCC 51372 AY766087.1</p> <p>97 % <i>Mycoplasma sp. Sgv2c</i> GQ150566.1</p> <p>97 % <i>Mycoplasma sp. Sgv2b</i> GQ150565.1</p> <p>97 % <i>Mycoplasma sp. Sgv2d</i> GQ150567.1</p>

<i>Larus michahellis</i>	Gen ARN Ribosómico 16 S	
	<p>GGATAACGCTGGCGCATGCCTAATACATGCAAGTCGATCGGATGTAGCAATACATTAGAGCGGAA CGGGTGAAGTAACAGTATCCAATCTGCCTTATAGTGGGGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAATA CCGCATAACAAGTTAATTCGCATGAGAATAAATTTAAAGAAGCAACTGCTCCGCTAATAAGATGAG GGTGGCGCATATCAGCTAGTTGGTGGAGGTAATGGCCCAAGGGCGATGACGTGTAGTTATGCTG AGAGGTAGAATAACCAATGGGACTGAGACAGCGCCATCTCCACGGAGGCGAGCAGTAGGG AATTTTTCACAATGGAGAAAGTCTGATGGAGCAATGCCCGTGAACGATGAAGGCTTTTTAGATT GAAAGTCTTTTTTTGGGAAGAAAAGTCAAGTGTAGAGTGAAGGCTTACGCTGACGGTACCCATT GAATAAGTAACGACTAATATGTGCCAGCAGTCCGGTAATACATAGGTTGCAAGCTTATCCGGA TTTATTGGCGTAAACAGCGCAGGGCGATTAGAAAAGTCTGGTGTAAAGCAATTGCTTAAACGA TTGATGCTTGGAACTTCTAGTCTAGAGTTTGGTAGAGAGTCTGGAACTCCATGTGGAGCGGTG AAATCGTAGATATATGGAAGAACACAGAGGGGAAAGCGGAGGACTTGGGCAATCTGACGCTT AGGCTTGAAGTGTGGGAGCAAAATAGGATTAGATACCTAGTAGTCCACACTGAAACGATGGAT GTTAAAGTTCGGAGCGAATACTCGGTGCTGACGATTAACACATTAACATCCTGCTGAGTAGTACA TTCGAAGAATGAACTCAACGGAATTGACGGGGACCCGCAACAAGTGTGGAGCATGTTGCTTAA TTCGACGGTACAGAAAACTTACCTAGACTTGTGCTGACGCTGCTGCTGAGATGTTGGTTAAAGT GGTTAACCAATGACAGGTGCTGATGTTGCTGCTGACGCTGCTGCTGAGATGTTGGTTAAAGT CCGCAACGAGCGCAACCTTCTGTTAGTCTTCTAACGAGACTGCAACGATGAAGTGGAGGA AGGTGGGATGACGTCAAATCATGCCCCCTATGTCTAGGGCTGCAACGCTGCTCAATGGCCA ATACAAACAGTCCAAACCCGTAAGCGGAGTAACTCTGAAAAGTGTGCTCAGTTCGGAATTGAGG GTGCAATTCCCGCTCAAGTGGAACTCACTAGTAACTCGCAATCAGCCATGTCGCGGTGAATAC GTTCTCGGCTTGTACACACCGCCCTCAACTATGAGAGCTGTAATATCTAAACCGTGTGCT AACCGCAAGGAGCGCATGTCTAGGGTAGGGCCGGTATTGGAGTTAAGTCGTAACAAGGTACCC CTACGAGAAGCTG</p>	<p>99 % <i>Mycoplasma sp.</i> 27635 partial 16S rRNA gene, strain 27635 FM878638.1</p> <p>99 % <i>Mycoplasma gallisepticum</i> str. F, complete genome. CP001873.1 99 % <i>Mycoplasma gallisepticum</i> strain A5969 genomic large direct repeat and flanking sequences. L35043.3</p> <p>99 % <i>M. gallisepticum</i> 16S small subunit ribosomal RNA M22441.1</p>
	T158T	
Región intergénica (ISR)		
	<p>AAAACCGTGTGCTAACCGCAAGGAAGCGCATGTCTAGGGTAGGGCCGGTATTGGAGTTAAGTC GTAACAAGGTACCCCTACGAGAACGTGGGGGTGGATTACCTCCTTTCTATGGAGTATTAATAACAC TAACACGATATACACCTGTTACATATAACGGTGAATAATAAAATCAACAAAAGGTTAAACCCAT TAAAGCAAATTTAATAAAGTTGTTGGTCAAGTTCTGTCAGTTATCAAGGGGCATTAATATT TTTATCATTAGAAACCTCTTATCCACGGATC</p>	
	Gen ARN Ribosómico 16 S	
	<p>GGATAACGCTGGCGCATGCCTAATACATGCAAGTCGATCGGATGTAGCAATACATTAGAGCGGAA CGGGTGAAGTAACAGTATCCAATCTGCCTTATAGTGGGGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAATA CCGCATAACAAGTTAATTCGCATGAGAATAAATTTAAAGAAGCAACTGCTCCGCTAATAAGATGAG GGTGGCGCATATCAGCTAGTTGGTGGAGGTAATGGCCCAAGGGCGATGACGTGTAGTTATGCTG AGAGGTAGAATAACCAATGGGACTGAGACAGCGCCATCTCCACGGAGGCGAGCAGTAGGG AATTTTTCACAATGGAGAAAGTCTGATGGAGCAATGCCCGTGAACGATGAAGGCTTTTTAGATT GAAAGTCTTTTTTTGGGAAGAAAAGTCAAGTGTAGAGTGAAGGCTTACGCTGACGGTACCCATT GAATAAGTAACGACTAATATGTGCCAGCAGTCCGGTAATACATAGGTTGCAAGCTTATCCGGA TTTATTGGCGTAAACAGCGCAGGGCGATTAGAAAAGTCTGGTGTAAAGCAATTGCTTAAACGA TTGATGCTTGGAACTTCTAGTCTAGAGTTTGGTAGAGAGTCTGGAACTCCATGTGGAGCGGTG AAATCGTAGATATATGGAAGAACACAGAGGGGAAAGCGGAGGACTTGGGCAATCTGACGCTT AGGCTTGAAGTGTGGGAGCAAAATAGGATTAGATACCTAGTAGTCCACACTGAAACGATGGAT GTTAAAGTTCGGAGCGAATACTCGGTGCTGACGATTAACACATTAACATCCTGCTGAGTAGTACA TTCGAAGAATGAACTCAACGGAATTGACGGGGACCCGCAACAAGTGTGGAGCATGTTGCTTAA TTCGACGGTACAGAAAACTTACCTAGACTTGTGCTGACGCTGCTGCTGAGATGTTGGTTAAAGT GGTTAACCAATGACAGGTGCTGATGTTGCTGCTGACGCTGCTGCTGAGATGTTGGTTAAAGT CCGCAACGAGCGCAACCTTCTGTTAGTCTTCTAACGAGACTGCAACGATGAAGTGGAGGA AGGTGGGATGACGTCAAATCATGCCCCCTATGTCTAGGGCTGCAACGCTGCTCAATGGCCA ATACAAACAGTCCAAACCCGTAAGCGGAGTAACTCTGAAAAGTGTGCTCAGTTCGGAATTGAGG GTGCAATTCCCGCTCAAGTGGAACTCACTAGTAACTCGCAATCAGCCATGTCGCGGTGAATAC GTTCTCGGCTTGTACACACCGCCCTCAACTATGAGAGCTGTAATATCTAAACCGTGTGCT AACCGCAAGGAGCGCATGTCTAGGGTAGGGCCGGTATTGGAGTTAAGTCGTAACAAGGTACCC CTACGAGAAGCTG</p>	<p>99 % <i>Mycoplasma sp.</i> 27635 partial 16S rRNA gene, strain 27635 FM878638.1</p> <p>99 % <i>Mycoplasma gallisepticum</i> str. F, complete genome. CP001873.1 99 % <i>Mycoplasma gallisepticum</i> strain A5969 genomic large direct repeat and flanking sequences. L35043.3</p> <p>99 % <i>M. gallisepticum</i> 16S small subunit ribosomal RNA M22441.1</p>
T264T		
Región intergénica (ISR)		
	<p>AAAACCGTGTGCTAACCGCAAGGAAGCGCATGTCTAGGGTAGGGCCGGTATTGGAGTTAAGTC GTAACAAGGTACCCCTACGAGAACGTGGGGGTGGATTACCTCCTTTCTATGGAGTATTAATAACAC TAACACGATATACACCTGTTACATATAACGGTGAATAATAAAATCAACAAAAGGTTAAACCCAT TAAAGCAAATTTAATAAAGTTGTTGGTCAAGTTCTGTCAGTTATCAAGGGGCATTAATATT TTTATCATTAGAAACCTCTTATCCACGGATC</p>	
	Gen ARN Ribosómico 16 S	
	<p>AGGTTAACAGAAATGACAGATGGTGCATGGTGTGCTGACGCTGCTGCTGAGATGTTGGTTAAGT CTTGCAACGAGCGCAACCTTATCTTACTTACTACCAATTAAGTGGAGACTCTAAGGAGACTGCC GAGTAATCGGGAGGAAAGTGGGGACGCTCAATCATCATGCTCTTACGAGTGGGGTACACACA CTGTCTACAATGGACAGTCAAAAGAGATGCAATATGGTCCATTGAGCTAACCTCAAAAACTGTT TCAAGTGGGATGAAGTCTGCAACTGCACTTCAAGTGGAACTCGTAAATGATGATGATGATGATG ACGCTACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTGTACACACCGCCCTCAACCATGGGAGCTGGAATGC CCGAAGTGGTTTAAAGAACTGCTCAAGGAGGACTGCTGAGTGGGTTAAGTCGTAACAAGG TATCTACGAGAAGCTG</p>	<p>97 % <i>Mycoplasma sp.</i> 39CL partial 16S rRNA gene, strain 39CL AM182895.1</p> <p>97 % <i>Mycoplasma bovis</i> PG45 clone MU clone A2, complete genome CP002188.1</p>
T98T		

	<p style="text-align: center;">Gen ARN Ribosómico 16 S</p> <p>ATCATGTCATGTCGAGCGAGGCTTCGGACCTTAGCGCGAATGGGTGAGTAACACGTAACGCTACCTCAACGTAACCTTAGATTGGGATAGCGAACGGAACCTTGGATAATACCAAACTATTAGTTTCGCATGAACTTATATAAAAGGAGCCTTTAAAGCTCCGCTGAGAGATCGGGGTGCGCAACATAGCTAGTTGGT GAGGTAACGCCCAACAGGCGATGATGTTTAGCGGGGTTGAGAGACTGAACCCGACACCTGGGA CTGAGATACGCCCAAGACTCTACGGGAGGACAGTAGGGAATTTCCAATGAGCGAAAGCTT GATGGAGCGACACAGCGTGCAGGATGAAGTCTATGGATTGAACTGCTGTGGTAAGGGAAGA AAAAGTCATAGAGAAATGCTATGACATTGACGCTACCTATTAGAAAGCAACGGCTAACTATGTG CCAGCAGCCGGTAATACATAGGTTCAAGCGTTATCCGGAATTTGGGGTAAAGCGTCTGTA GGTGTTTAAAGTCTGGCTCAAAATTTGGGGCTCAACCCCAACCGCTGGATACTGGCAAACT TAGAGTTGTAGAGGTTAGCGGAATCTTGTGAAGCGGTGAAATGCGTAGATAAGGAAGAAC ACCATTTGGCGAAGCGGCTAACTGGGCATATAGACACTGAGAGACGAAAGCTGGGGAGCA AACAGGATTAGATACCTGTAGTCCGCTGAGTAGTACGTTTCGCAAGAATAAACTAAAGGAATT GACGGGATCCGCAAGCGGTGAGCATGTGGTTAATTTGAAGATACCGTGAAACCTAACCA CTCTTGACATCTCTGCAAAAGCTATAGAGATAGTGGAGTTAAACAGATGACAGATGGTGCATG GTTTCGTCAGCTGTGTCGAGATGTTGTTAAGTCTGCAACGAGCACAACCTTATCTCTTAG TTACTACATTTAGTTGAGGACTTAAGGAGACTGCCGAGTAATCGGGAGGAAGTGGGACGAC GTCAAATCATCATGCTCTTACGAGTGGGGTACACAGCTGCTCAATGGACAGTACAAGAGATG CAATAGGTGACATTGAGCTAACCTCAAAAAGTCTTCAAGTTCGAGTTGAAGTCTGCAACTCGAC TTATGAAAGTGGTAATGCTAGTAACTGATGACGCTACGCTACGCTGTAATGCTTCCGGTCTT GTACACACCGCCCTCAACATGGGAGCTGTAATGCCGAGTCCGGAAGTCTGTTTAAAGAACTGCCT AAGCAGGACTGGTACTGGGTTAAGTCTGAACAAGGTATCTTACGAGAA</p>	<p>96 % <i>Mycoplasma maculosum</i> strain Skotti FJ595090.1</p> <p>96 % <i>Mycoplasma maculosum</i> strain PG15 NR_025066.1</p> <p>95 % <i>Mycoplasma</i> sp. 13T2 partial 16S rRNA gene, strain 13T2 FM878041.1</p> <p>95 % <i>Mycoplasma</i> sp. 11CL2 partial 16S rRNA gene, strain 11CL2 AM182893.1</p>
<p style="text-align: center;">T391T</p>	<p style="text-align: center;">Región intergénica (ISR)</p> <p>AATACACACCCCGTCAAACTGGGAGCTGATAATGCCGAAAGTCGGTTTATAAGAACTGCCT AAGCAGGACTGGTACTGGGTTAAGTCGTAACAAGGTATCCCTACGAAAGCTGGGGATGGAT TACCTCCTTCTACGGAGTACATTTGTAATTAATTAACCACTAACTACTAAAAAATGACAGCTGT TATCATATATATTTATGTCATGTGACTCTTAAAGTCAAAAGTCTATATCTAGTTTTGAGAGAATATCT CCAATTTGTTTGAAGAACTGAATAGTAAATTTTTGATATTTACAACGACATCAAAATAAATTAATT TGGTTAATTTGTTTGTATCATCGAGTAACTTTAATGATTCAATGAAATGCTTAAATACACA TCTGTAACAACAATAGGAATATACCTTTAAATGAAGGAGAGTTTGGTGGATGCCTTGGGCTGGA AGTCGATGAAGGACGCTG</p>	
	<p style="text-align: center;">Gen ARN Ribosómico 16 S</p> <p>TCAGGATGAACGCTGGCTGTGTGCTAATACATGTCATGTCGAGCGAGGTTTTTCGGAACCTAGCGG CGAATGGGTGAGTAACAGCTAATCTGCCCTTAGATTGGAATACCAATGGAACATTTGGCTA ATGCCGATATGACGAGAATCGATGATCTTTTGTGAAGGGGCTTTAAAGCCCGCTAAAGGA TGAGGTTGCGGAACATTAGTTAGTTGGTAGGTAATGGCTCAACGACTATGATGTTAGCCGGG TCGAGAGACTGAACGCCACATTTGGGACTGAGTACGCGCCAACTCTACGGGAGGACGAGTA GGAATTTCCAATGAGCGAAAGCTTGAAGGCGACACAGCTGACAGTGAAGTCTTCGG ATTTGAAAGTCTGTTATAGGGGAAGAACCTTTAAAGGAAATGCTTTAAAGCTGACGCTACCC GTCCAGAAAGCGATGGCTAATGTCGACGAGCCGCGTAATACATAGCTGCAAGCGTTATCC GGAATTTGGGCTAAAGCGTCTGATGCTGTTTAAAGTCTGGAATCAAACTGGGGCTCAA CCCCCTGCTTTGATACGCAACTAGAGTTAGTAGAGGTAAGCGAATTCATGTGAAGC GGTGAATGCGTAGATATAGGAAGAACAACAAAGCGGAGGACGCTACTGGGCTACACTGAC GCTGAGGACGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATGATACCTGGTAGTCCAGCCGTAACAGCA TGATCATTAGTGGTGAAGGACTCACTGACGACGATCAACGATTAATGATCCGCTGAGTAGTATG CTCGAAGATGAACTTAAAGAAATGACGGGAGCCGCAACAGCGGTGAGCATGTGGTTAA TTTGAAGATACAGGAAAGCTTACCCTCTTGCATCTCCGCAAAAGCTATAGAGATATAGTGA GGTAAACGGAATGACAGATGTTGTCATGTTGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCG TCGAACGAGCGCAACCCCTTCTTAACTAAGGAGTATGTCGAGGACTCTAGAGATACCTGCC TGGTAACTGGGAGGAGCGGGGATGACGCTCAATCATCATGCTCTTACGAGTGGGGTACAC ACCTGCTCAATGTTGCGTACAAGAGAAAGCAATGAGGCGACATGGAGCAAACTCAAAAAGCCG ATCTCAGTTCGGATTGGAGTCTGCAATTCGACTGCTGCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCA GCTATGCTGCGGTAATGCTTCCGGGCTTGTACACACCGCCCTCACACCAAGGAGCTGGTAA TACCAAGGCTGTTTCTAACCTCGGAGGCGCCCTAACGTTAGGACTGTCGTCGTCGTCGTCGTCG TCGTAACAAGGATCCATTACGAGAA</p>	<p>96 % <i>Mycoplasma</i> sp. 13CL AM182891.1</p> <p>96 % <i>Mycoplasma spumans</i> AF538684.1</p> <p>96 % <i>Mycoplasma</i> sp. G.A. partial 16S rRNA gene, strain G.A. FR682077.1</p>
<p style="text-align: center;">T50T</p>	<p style="text-align: center;">Región intergénica (ISR)</p> <p>TATCCCTACGAGAAGTGGGATGGATCACCTCTTCTACGGAGTACACTAGTTATGGAACGAAT ATTTGATCCAGTTTTGAGAGAATATATCTCTTTTTGTTCTTTGAAAAGTGAATAACGACTTGATA TATTTAATTAATATTTCAAGTTTATAGTCAACCTATAGAATATTTATAGACAACAATAGCTATACAA CAAATACATAACAACAACCTAATAACAAGATAAGAGTTTTGGTG</p>	
	<p style="text-align: center;">Gen ARN Ribosómico 16 S</p> <p>GGCTCAGGATGAACGCTGGCTGTGTCTAATACATGTCATGTCGAGCGGAGTTTCYTTGGGAAAGC TTAGCGGCGAATGGGTGAGTAACAGCTAATCTACCTCTAGACTGGAATACCCATGGAAC ATTTGTTAATGGGATGCGCATGAGATCGATGATCGAGGTGTAAGGGGCTTAAAGCCCTCA CTAAAGATGAGGTTGCGGAACATAGCTAGTTGTTGAGGTAATGGCTTACCAAGGCTATGATGTT TAGCCGGTGCAGAGACTGAACGCCACATTTGGGACTGAGATACGCCCAAACTCTACGGGAGG CAGCAGTAGGGAATTTCCAATGAGCGAAGCTGATGAGGAGCGACACGCTGACAGTACG GTCTTCGAGTTGTAAGTCTGTTAATAGGGAAGAACACCTTAGTTGAGGAAATGCTTAAAGCTGAC GGTACTTTCAGAAAGCGATGGCTAATGTCGAGGAGGAGGCGGTAATACATAGTTCGCAAGC GTTATCCGGAATTTGGGCTAAAGCGTTCGTTAGGCTGTTTAAAGTCTGGAGTCAAAAGCCCG GGCTCAACCCCGTTGCTTTGATACGCAAACTAGAGTTAGATAGAGGTAAGCGGAATTCCTA GTGAAGCGGTGAAATGCTGATATATGGAAGAACAACAAAGGCGAAGGCACTTACTGGGCTCTA TACTGACCTGAGGAGCAAAAGGCTGGGAGCAAAAGGATGATACCTGCTGAGTCCAGCCG TAAACGATGATCAATGCTGGTGAAGTTCGCTGACGAGCAATGCAATAAATGATCCGCTGA GTAGTATGCTCGCAAGAGTAACTTAAAGGAATGACGGGAGCCGCAACGCGGTGGAGCATG TGGTTAATTTGAGATACACGGAGAACTTACCCTCTTGAACATCTCCGCAAGCTATAGAGAT</p>	<p>96 % <i>Mycoplasma spumans</i> AF538684.1</p> <p>96 % <i>Mycoplasma</i> sp. G.A. partial 16S rRNA gene, strain G.A. FR682077.1</p> <p>96 % <i>Mycoplasma spumans</i> strain PG13 NR_024980.1</p> <p>95 % <i>Mycoplasma phocicerebrale</i> strain CSL 5195S2 DQ840513.1</p>
<p style="text-align: center;">T350T</p>		

<i>Larus ridibundus</i>	T265T	<p style="text-align: center;">Gen ARN Ribosómico 16 S</p> <p>ACCTGCCTCAGGATGAACGCTGGCTGTGCCTAATACATGCATGTCGAGCCGGAGTCTTCGGGAAC TTAGCGCGAATGGTGAGTAACACGTAACACTAAGCGTCCCTCTAGATTGGAAATACGATGAGAAAT TATCGCTAATGCCGATACTTAAGAATCCGATGATTTTATAAAAAGGAGCGTTGCTTCACTAG AGGATCGGGTGGTAACATTAAGTGGTGAAGTAATGGCTTACCAAGGCGATGATGTTTAGC GGGGTTGAGAGACTGATCCGCCACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCTCAGGGAGGCAGC AGTAGGGAATTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCGACACAGCGTGCAGGAAGACGGCCT TCGGGTTGTAACCTGCTGTATAAGGGAAGAAAAGCAAGATAGGAAATGATTTGCTTGACGGT ACCTTGTGAGAAAGCAACGGCTAAGTGTGCGCAGCCGCGTAATACATAGGTTGCAAGCGTT ATCCGGAATTTAGGGCGTAAAGCGTGTAGGTTGTGTGTTAAGTCTGACGTCAAAATCTTGGAGC TCAACTCCAAATCGGTTGGATACTGGCACGCTAGAATTTGTAGAGGTTAGCGGAAATCTTAGTGA AGCGGTGAAATCGTAGAGATTAGGAAGAATCAACATGGCGAAGGCGAGTAACTGGGCACATA TTGACACTGAGAGACGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTA AACGATGATGATTAGCTGATGGGAACATCGGCGCAGCTAACGCTAAATCATCCGCTGAGTAG TATGCACGCAAGTGTGAAACTTAAAGGAATGACGGGGATCCGCCAAGCGGTGGAGCATGTGGT TTAATTTGAAGATACGCTAGAACCTTACCCTCTGACATCTCCCAAGCTATAGAGATATTTGG GGAGGGTTTTTC</p>	<p>99 % <i>Mycoplasma sp. 38104</i> partial 16S rRNA gene, strain 38104FM878637.1</p> <p>97 % <i>Mycoplasma buteonis</i> strain BbT2g NR_025177.1</p> <p>96 % <i>Mycoplasma sp. 10T4</i> partial 16S rRNA gene, strain 10T4 AM182896.1</p>
	T270T	<p style="text-align: center;">Región intergénica entre los genes 16S y 23S rDNA (ITS)</p> <p>TTGTACACACCCCGCTCACACCTAGGAGCTGGTAATACCCAAAGTCGGTTGCTAACCTCGGAGG CGACTGCTAAGTAGGACTGGTGGTGGTGAAGTCTGTAACAGGATTCCTCAGGAACGTTG GGGATGGATCACCTCTTCTACGGAAGTACACTAGTTATGGAAATTAATTTGATCCAGTTTGGAG AGAACTAATATCTCTTTTTGTTCTTTGAAAACGTAATACGACATTGAAAAATTTATTAATATTT CAAAGTTTAGATCAACTATAGAATATTTATAGAAAAGCAAAATAGGCTACACAAAAACAA AATTTAACTATTAACAAGATAAGATTTTTGGTGGATCGCTTAGATCTGGAAGTCGATGAAGGACG TGCAAAACCTG</p>	<p>89% <i>Mycoplasma sp. A1802</i> FM196529.1</p> <p>86 % <i>Mycoplasma phocicebrale</i> strain CSL 5195S2 DQ840513.1</p> <p>86 % <i>Mycoplasma phocidae</i> strain C264-NAS 16SGU905028.1</p>
<i>Milvus migrans</i>	T196T	<p style="text-align: center;">Gen ARN Ribosómico 16 S</p> <p>CTATGTGCCAGCAGCCGGTAATACATAGTTGCAAGCGTTATCCGGAAATTTGGGCGTAAAGC GTCTGTAGGTTGTTAGTTAAGTCTGGCGTAAAACCTGGGGCTCAACCCAAATCGCGTTGGATACT GGCTAACTAGAATTGTAGAGGTTAACGGAAATCTTGGGAAGCGGTGAAATGCGTAGATATAAG GAAGAACATCAACTGGCGAAGGCAAGTAACTGGGCACATATTGACACTGAGAGACGAAAGCGTG GGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCAGCCGTAACAGATGATGATTAGCTGATGGGAA CCATCGGCGCAGCTAACGATTAATCATCCGCTGAGTAGTATGCTCGCAAGAGTGAATCTAAAG GAATTGACGGGGATCCGCACAAAGCGTGGAGCATGTGGTTAATTTGAAGATACGGGTAGAACCTT ACCCACTTTGACATCTTCTGAAAGCTATAGAGATATAGTGGAGTTAAACAGAAATGACAGATGGTG CATGGTTGCTGCTGAGTCTGCTGAGATGTTGCGTTAAGTCAAGCGAGCGCAACCTTATTC TTAGTTAAATCTCAAGGAGACTGCCGGTAACTGGGGAAGGTTGGGACGACGCAATCAT CATGCTCTTACGAGTGGGGCAACACAGCTGCTACAATGGAGGTTACAAAGAGAAGCAATATGGTG ACATGGAGCAAATCTCAAAAACCTTTCTCAGTTCGGATTGATGCTCAACTGCACTACATGAAGT CGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCTACGCTACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTGTACACACCG CCGTCACACCATGGGAGCTGGTAATGCCGAAAGTCGGTTAGTCAACTACGGAGACAACTGCCTA AGGCAGGACTGGTACT</p> <p style="text-align: center;">Región intergénica (ISR)</p> <p>AGTCGGTTTAGTCAACTACGGAGACAACCTGCTAAGGCAGGACTGGTACTGGGGTGAAGTCGTAA CAAGGTATCCCTACGAGAACGTGGGATGGATTACCTCCTTCTCAGGAGTACACATAAATAACATT TATTGTTACTAATACCTTTTTATAAAACAAATAATTTTGTCAATATATCTAGTTTTGAGAG GACTTCTCTCAATTGCTTTTGAAGAACTGAATAGTAAGATATTAATATAACCAACGACATCAAAAA TAAATTAATTAATTAGTCAATTTTGTGATACCGAGAAATTAAGAAATAAATTCGTTAAA ATGCTTTGAATACATCAACCAATAGGAAAATATTGTTCAACTTTTAAATAGTAAGATTTTGTG GTGGATGCTGGGCTCGAAAGTCGATGAAGGAC</p>	<p>99 % <i>Mycoplasma sp. Sgv1b</i> GQ150563.1</p> <p>99 % <i>Mycoplasma sp. 1449</i> partial 16S rRNA gene, type strain 1449T. FM196532.1</p> <p>98 % <i>Mycoplasma verecundum</i> AF412989.1</p> <p>98 % <i>Mycoplasma sp. SF9</i> EU544228.1</p> <p>98 % <i>Mycoplasma sp. ARNO</i> EU544230.1</p>

<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Morus bassanus</p> <p>T125T</p>	<p style="text-align: center;">Gen ARN Ribosómico 16 S</p> <p>CCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCTGTGCTAATACATGCATGTCGAGCGGAGTTCTCGGAACTT AGCGGGAATGGGTGAGTAACACGTACTTAACTGCCCCTCAGATTGGGATAACGCTGAGAAATTA GCGTAATACCGGATACTTAGCAATTCGCATGAAGTTGCTATAAAGGAGCTYAAAGTCTCACTG AAGGATCGGGGTGCTTACATTAGCTAGTTGGTAGGTAATGGCTCAAGCGATGATGTATAG CGGGTTGAGAGACTGATCCGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCTACGGGAGGAGC CAGTAGGGAAATTTCCCAATGGGGAAAGCCTGATGGAGCGACACAGCTGCGAGGATGACGGCC TTCGGGTTGAACTGCTGTATAAGGGAAAGAAAAACAGAGGAGGAAATGCCTTTGTCTGACCG TACTTGTACAGAAAGCAACGGCTAACTATGTGCCAGACCGCGGTAATACATAGTTGCAAGCGT TATCCGGAATATTTGGGCTAAAGCGTCTGTAGTTGTATGTTAAGCTCGGCTCAAACTGGGGC TCAACCCAAATCGGTTGGATACTGGCATGCTAGAATTGTAGAGGTTAGCGGAATTCCTAGTGA AGCGGTGAAATCGGTAGATATTAGGAAGAACCAACATGGGAAGGACAGTAACTGGGCACATA TTGACACTGAGAGACGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTA AACGATGATGATTAGCTGATGGGAACCATCGGCAGTAAACGATTAATCATCCGCTGAGTAG TATGCTCGCAAGAGTGAACCTTAAAGGAATTGACGGGGATCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGTT TTAATTGAGATACGCTAGAACCTTACCACCTCTTGCATCTCCGCAAGCTATAGAGATATAGT GGAGGCTAACGGAATGACAGATGGTGCATGTTGCTGCTCAGCTCGTCTGAGAGATGTTGGTTAA GTCTCTAACGAGCGCAACCTTATCTTATGTTAGATGATCTAGGGAGACTCCGGAGTAATCCGGA GGAAGCGGGGACGACGCAATCATCATGCTCTTACGAGTGGGGCAACACAGCTGCTACAATG GATGTTACAAGAGAAAGCAAAACGGCGACGCTGGAGCAATCTCAAAAAACCTTCTAGTTCGGAT TGATGCTCAACTCGACTACATGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGTAGATCAGCTACGCTACGGTG AATACGTTCTCGGCTTGTACACACCCCGCTCACCAATGGGAGCTGTAATGCCGAAATCGGT TTTGTAACTTCGGAACAACCTGTAAGGCAGGACTGGTGA</p> <p style="text-align: center;">Región intergénica entre los genes 16S y 23S rDNA (ITS)</p> <p>CTACGGAGTACGACGATTGTTTAAAAAATCAACCTTAAACGAGACTTTTATACAAAATGATAATGT TACAAGAAGCTCATGTGCTAAGTAAATGCTTATAGATATATCTAGTTTTGAGAGAACTTTTCTCTCT TGTCTTTTAAAACTGAATAGTAAAGATATTACAACGACATCAACAAATTAATAAATATGTCGAA TTGTTTTGATACCGGATTAATTAATTAATAAATAATTAATGAAATGTCTGAAATACATCAAC AACAATAGTCAAAATTTTACAACCTTTTAAATAAGTAAGATTTTGTGGATGCTTGGGCTG GAAGTCGATGAAGGACGTG</p>	<p>96 % <i>Mycoplasma sp. 10T4</i> partial 16S rRNA gene, strain 10T4. AM182896.1</p> <p>96 % <i>Mycoplasma glycyphilum</i> strain 486 NR_025184.1</p> <p>96 % <i>Mycoplasma gallopavonis</i> strain WR1 FJ226577.1</p>
<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Neophron monachus</p> <p>T193T</p>	<p style="text-align: center;">Región intergénica entre los genes 16S y 23S rDNA (ITS)</p> <p>TGTACACACCGCCCTCACACCATGAGGCTGTGTAATGCCGAACTCGTTTGTCAACTACGGAG ACAACCTGCTAAGCGAGGACTGTTGACTGGGGTAAAGTCGTAACAAAGTATCCCTACGAGAACGT GGGGATGGATTACTCTTCTTACGGAGTACACATAAATAACATTTATGTTACTTAATACCTTTTT ATAAAACAAATATTTTGTCAATGGGATATATCTAGTTTGGAGGAGACTTCTCTCAATGTTCTTGA AACTGAATAGTAAAGATATAATATAACACGACATCAAAAAATTAATAGTCAATTTGTTTGTGAT ACCGAATAATATTAGAAATAATAATTCGTTAAATGCTTTTGAATACATCAACAAATAGGAAAA TATTGTTACAACTTTAAATAAGTAAGATTTTGTGGATGCTTGGGCTGAAAGTCGATGAAGG AC</p>	<p>99 % <i>Mycoplasma sp. 1449</i> FM196533.1</p> <p>97 % <i>Mycoplasma sp. Sgv1a</i> GQ150562.1</p> <p>94 % <i>Mycoplasma verecundum</i> AY781781.1</p>
<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Nycticorax nycticorax</p> <p>T311T</p>	<p style="text-align: center;">Gen ARN Ribosómico 16 S</p> <p>GGCTCAGGATGAACGCTGGCTGTGCTAATACATGCATGTCGAGCGGGGTTCTTTAGAACCTA GCGGCGAATGGGTGAGTAACACGTACTTAACTGCCCCTCAGATTGGGAATAACGCTGAGAAATAG CGTAATCGCGGATACTTATTTTATGCTAATAAATAAAGGAGCGTTTCTCACTAGAG GATCGGGGTGCGGAACATTAGCTAGTTGGTAAGTAAAGGCTTCAAGGCGATGATGTTAGCGG GGTTGAGAGACTGATCCGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCTCTACGGGAGGAGCAGC TAGGGAAATTTCCCAATGAGCGAAAGCTTGTAGGAGCGACAGCGTGTGCGATGACGCGCTTCG GGTTGAAAGCACTGTTAATAGGGAAGAAAAAGCACTATAGGAAATGATAGTGCCTTGACGCTACC TTGTCAAGAAAGCAACGCTAATATGTGTCAGCAGCCGCGGTAATACATAGTTGCAAGCGTTATC CGGAATATTGGGCGTAAGGCTGCTGATGTTGTTTAAAGTCTGGGCTCAAACTGGGCTCAAC CCCAATTCGGTGGATAGACTGATAGACTAGAGTTTATTAGAGTTAATGGAAATTCCTTGTGAAGCG GTGGAATGCTGATATAAGGAAGAACCAATTTGGGGAAGCAATTAAGTGGGAATACTAGTAACTGAC ACTGAGAGACGACGCGTGGGAGCAACAGGATTAAGATACCTGGTAGTCCAGCCGTAACGA TGATGATTAGCTGGGGAGACCCCGGCGAGCTAAAGCAATTAATCATCCGCTGAGTATGATG ACGCAAGTGTGAAACTTAAAGGAATGACGGGACCCGCAAGCGGAGGATGAGCATGTTGTTAAT TGAAGATACGCTAGAACTTACCACCTTTGACATCTTCCGCAAGCTATAGAGATATAGTGGAGG CTAACGGATGACAGATGGTGCATGTTGCTGACTGCTGCTGAGATGTTCCGTTAAGTCT GCAACGAGCGCAACCTTATCTTATGTTAATGTTCTGAGGAGACTGCTAGGTAATAGGAGAA GTGGGGATGACGCAATCATGCTCTTACGAGTGGGGCAACACAGCTGCTACAATGGGTAG TACAAAGAGACGCAACAGCGATGTTAAGCAAACTCAAAAACTCCCAAGTTCGAAATGGAG TCTGCAACTGACTCCTAAGTGGAACTGCTGATTAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG TTCTCGGCTTGTACACACCCCGCTCAACCGGAGCTGGTAATGCCGAAAGTCCGTTTGT TAACTACGGAACACCCGTAAGGACGAGCTGGTACTGGTTAAGTAAAGTAAAGGATTAACCT ACGAGAACGTTGGGATGGGATTACC</p>	<p>95 % <i>Mycoplasma columborale</i> strain FG298 EU859978.1</p> <p>95 % <i>Mycoplasma citelli</i> strain RG1D-S EU925164.1</p> <p>94 % <i>Mycoplasma cricetuli</i> strain CH 16S EF036469.1</p>

<p>Otus <i>scops</i></p>	<p>T459T</p>	<p style="text-align: center;">Gen ARN Ribosómico 16 S</p> <p>CTCAGGATGAACGCTGGCTGTGTGCCTAATACATGCATGCTGACGCGATGGTAGCAATATCATAGCG GCGAATGGGTGAGTAAACAGCTACTCAACGTACCCTTACAGATTGGGATAGCGGTTGGAAACAACCGA TAATACCAATACCTATAAGTTTCGCATGAAGCTTATAAAAAGATCCGTTTGGATCGCTGGAGGAG CGGGGTGCGCAACATTAGCTTGTGGTGAAGTAAAGGCTCCCAAGGCGATGATGTTTAGCGGGG TTGAGAGACTGATCCGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCTACGGGAGGACGAGTA GGGAATATCCCAATGGGGAAGCCTGATGGAGCGACACAGCGTGAAGGATGAAGGCTCATG GATTGAAACTTCTGTGAAGGAAGAAAAAGTAGTGTAGGAAATGACATTACCTTACGCGTACC TTATTAGAAAGCAACGGCTAACTATGTCCAGCAGCCGCGTAATACATAGTTGCAAGCTTATCC GGAATTTGGGCGTAAAGCTGTGTAGTTGTTTAAAGTCTGGCGTCAAAATTTGGGCTCAAC CCCAATCGCGTGGATACTGGCAGACTAGAGTTATGTAGAGTTAGCGGAATTCCTTGTGAAGCG GTGAATCGTAGATAAAGGAAGAACCAATATGGCGAAGGCGACTAAGACATACACTGAC ACTGAGAGACGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGTACCTGGTATGCCAGCCCTAAACGA TGATCATTAGCTGATGGAATTCATCGGCGAGCTAACGCATTAAATGATCCGCTGAGTATGACG TTCGAAGAATAAACTTAAAGGAATTGACGGGGACCCGCAAAAGCGGTGGAGCATGGTTTAAAT TTGAAGATACGGGTAGAACCTTACCACCTTGTGACATCTTCTGCAAAAGCTATAGAGATATAGTGGAG GTTAACAGAAAGACAGATGGTGCATGGTTGCTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTCCGTTAAGTCC TGCAACGAGCGCAACCTTATCCTTAACTAATCATTAGTTAGGACTCTAGGAGACTGCCCAA GTAATTTGGGAGGAGTGGGAGCAGCTCAAACTCATGCTCCTTACGAGTGGGGCAACACAG TGCTACAATGGTGTCAAAAGGAAGCAAAAGCAGCTGAGGAGCAACCTCAAAACCATTTCT CAGTTCGGATTAGTCTGCACTGACATCAATGAGTGGGATCGGATCGTAAATCGTAAATACACATCAA CGCTACGGTAATACGTTCTCGGGCTTGTACACACCCGCGTCAACATGGGAGCTGGTAAATCGG CGAAGTCGGTTTAAACAACTGCTAAAGCAGGACTGTGACTGGG</p> <p style="text-align: center;">Región intergénica (ISR)</p> <p>GCCCGTCAAACTGGGAGCTGTAATGCCGAAGTCGGTTTAAACAACTGCCTAAGGACGGA CTGTGACTGGGTTAAGTGTAAACAGGTATCCCTACGAGAAGTGGGATGGATCACCTCCTT CTACGGAGTCAAAAAGCTATTTTATAGTTTAACTTTTACTAGACCTAATTTATTTTTG TTGTGTCTTTTTCTGGTCTAAAAGCTTATATCTAGTTTGAAGGAAACATCTCAAAATGTTCT TTGAAAATGAATAGTAAATTTTAAAATTTTAAACAGCATCTTAAATAAATTAAGGTTTATTT GTTTTGATTCATCGAGTAACTATATCTAAATATGATTCTTGAATGCTTAAATAACACATCAA AACTAACAATAGGAAAATCTTTTAAATAGGAAGTTTGTGGTGGATGCCTTGGGTCTGGAAGT CGATGAAGG</p>	<p>95 % Mycoplasma sp. Sp22 FN394055.1</p> <p>95 % Mycoplasma sp. 72CL FM878039.1</p> <p>95 % Mycoplasma sp. 34CL AM182892.1</p> <p>95 % Mycoplasma agalactiae 5632 chromosome, complete sequence FP671138.1</p>
<p>Rissa <i>tridactyla</i></p>	<p>T396T</p>	<p style="text-align: center;">Gen ARN Ribosómico 16 S</p> <p>ACTATGTGCCAGCAGCCGCGTAATACATAGTCCGAAGCTTATCCGGAATTTGGGCGTAAAG CGTTCTGTAGGCTTTGTTAAGTCTGAGTCAAAAGCCGGGGCTCAACCCCGTCCGCTTTGGATAC TGGCAAACTAGAGTTAGATAGAGGTAAGCGGAATTCATGTGAAGCGTGAAATGCGTAGATATAT GGAAGAACCAAAAGGCGAAGGAGCTTACTGGGTCTATCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGG GGAGCAAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGATCATTAGTCGGTGGAGAA TTCACTGACGAGTAAACGCAATAAATGATCCGCGTGAATGATGCTCGCAAGAGTGAACCTTAAA GGAATTTGACGGGACCCGCAAGCGGTGGAGCTGGTTTAAATTTGAAGATACACGGAGAAAC TTACCACTCTTGACATCTCCGCAAACTATAGAGATATAGTRAGGTTAAACGGAATGACAGATGG TGATGGTTTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGTTAAGTCTGCAACGAGCGCAACCCCTAT CTTTAGTTACTAACAGGTTATGCTGAGGACTGATAGATACGCGCGGTAAGTGGGAGGAAAGCGG GGGATGACGCAAACTCATGCTCCTTACGAGTGGGCAACACAGCTGCTCAATGTCGGTACA AAGAGAAAGCAATGGGACATGGAGCAAACTCAAAAAGCGGATCTAGTTCGGATTGGAGTCTG CAATTCGACTCCTAAGTGGAAATCGCTAGTAAATCGAGATCAGCTATGCTGGGTAATACGTTT TCGGGCTTGTACACACCGCCGTCACACCAATGGGAGTGGTAAATCCCAAGTCCGTTTGTCAACC TCGGAGGCGACTGCCTAAGGTAGGACTGGTGGTGAAGTCTGTAACAAGGTATCCCTACGA GAACGTTGGGATGGATCACCTCCTTCTACGGAGTACACTATAGTTATGGAATTAATTTGTATC CAGTTTTGAGAGAATAATATCTCTTTTTGTTCTTTGAAAATGAATAACGACATTGAAAATTTAT ATTAATTTCAAAGTTAGATCAACCTATAGAAATTTATTTATAGAAAAGACAAACATAGGTCAT ACAAAAAAAATTAATTTAAACAAGATAAGTTTTTGGTGGATGCCTTGGGTCTGGAAGTCGA TGAAGGACGTGCAAACTCGCAAC</p>	<p>98 % Mycoplasma phocicebrale strain CSL 5195S2 DQ840513.1</p> <p>95 % Mycoplasma phocidae strain CSL 5364 16S DQ521597.1</p> <p>95 % Mycoplasma hominis strain PG21, FP236530.1</p>
<p>Tetrao <i>urogallus</i></p>	<p>T541T</p>	<p style="text-align: center;">Región intergénica (ISR)</p> <p>TGTACACCCGCGTCAAACTGGGAGCTGTAATGCCGAAGTCGGTTTATAAAGAACTGCCT AAGCAGGACTGGTACTGGGTTAAGTCTGAAACAGGATCCCTACGAGAAGTGGGATGGAT TACCTCCTTCTACGGAGTACATTTGTAATTAATTAACACTAACTACTTAAAAATCAGACCTGT TATCATATATTTATGCTGACTCTTAAAGTCAAAGCTTATATCTAGTTTGGAGAGATATCT CTCAATTTGTTTAAAAGTGAATGTAATTTTGTATTTTAAACAGCATCTAAATAAATTAAT TGGTTAATTTGTTGATTCATGAGTAACTATTATTAATGATTCATTGAATGCTTAAATAACACA CTGTAAACAATAAGGAATATACCTTAAATAAGGAAGAGTTTGTGGATGCCTTGGGTCTGGA AGTCTGATGAAGACTGAA</p>	<p>92 % Mycoplasma maculosum strain Skotti B FJ595090.1</p> <p>92 % Mycoplasma leopharyngis AY762644.1</p> <p>92 % Mycoplasma maculosum strain ATCC AY973564.1</p>

Tyto alba	<p>Gen ARN Ribosómico 16 S</p> <p>TTGCAAGCGTTATCCGGGAATTATTGGCGTAAAGCGTCTGAGTTGTTGTTAAGTCTGGCGTCA AAATTTGGGGCTCAACCCAAATCGCGTTGGATACCTGGCAAGCTAGAGTTATGTAGAGGTTAGCGG AATTCCTGTGAAGCGGTGGAATCGGTAGATATAAGGAAGAACCAATATGGCGAAGGAGCGTA ACTGGACATACACTGACACTGAGAGACGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTA GTCACGCCCTAAACGATGATCATTAGCTGATGGAAATTCATCGGGCAGCTAACGATTAATGA TCCGCTGAGTAGTACGTTCCGCAAGAATAAACTTAAAGGAATTGACGGGGATCCGCAAGCGG TGGAGCATGTGTTAATTTGAAGATACGGGTAAACCTTACCACCTCTTGACATCTCCGCAAGCT ATAGAGATATAGTGGAGTCAACGGAATGACAGATGGTGCATGTTGCTGCTGAGTCTGCTGTA GATGTTCCGTTAAGTCTGCAACGAGCGCAACCTTGTCTTATGTTACAGCATTAGTTGGGGA CTAAGGAGACTGCCCGAATTTGGGAGGAAAGTGGGGACGACGCTCAATCATCATGCTCTTACG AGTGGGGCTACACACGCTCAATGGATGTTGACAAAGAGAAAGCAAGCAAGTGTGAGGAGCAA CTCAAAAACACTTCTCAGTTCCGATTGTTGCTGCAACTCGAACATGAAGTCGGAATCGCTAG TAATCGTAGACAGCTACGCTACGGTGAATACGTTCTCGGCTTGTATACACCCCGCTCAAAACA TGGGAGCTGTTAATCCCGAAGTCCGTTTATAAACAACTGCCTAAGGCAGGACTGGTACTGGGT AAGTCGAGCACG</p> <p>Región intergénica (ISR)</p> <p>CTTGACACCCGCGCTCAAACTGGGAGCTGGTAAATGCCGGAAGTCCGTTTATAAACAACTGC CTAAGGCAGGACTGGTACTGGGTTAAGTCTGTAACAGGTATCCCTACGAGAAGCTGGGATGG ATCACCTCCTTTCTAGCGAGTACAGAAAGCGCTATTTATAGGCTTAACTTATTATCAGACCTTA TTTTAAACGCTATGGCTTTTTAGGCTCAAAAAGCTTATATCTAGTTTTGAGAGAAACAACTC ATGTTCTTTGAAAACCTGAATAGTAAATTTTAAATATTTACAACGACATCAAAATAAATTTTGGT TAATTTGTTTTGATTCATCGAGTAAATCATATAACACATATGATTCTTGAATGCTCTAAAATACACAT CAATAACAACATAAACAATAGGAACATCTTTAAATAAGTAAGAGTTTGTGGTGGATGCCTTGGGT CTGAAAGTCGATGAAGGACGTGCAAA</p>	<p>96 % <i>Mycoplasma iners</i> strain 89R-D-3 FJ666133.1</p> <p>96 % <i>Mycoplasma columbinum</i> strain FG295 16S EU859979.1</p> <p>96 % <i>Mycoplasma sp. 72CL</i> partial 16S rRNA gene, strain 72CL. FM878039.1</p> <p>96 % <i>Mycoplasma sp. 34CL</i> partial 16S rRNA gene, strain 34CLAM182892.1</p>
	<p>Gen ARN Ribosómico 16 S</p> <p>TTGCAAGCGTTATCCGGGAATTATTGGCGTAAAGCGTCTGAGTTGTTGTTAAGTCTGGCGTCA AAATTTGGGGCTCAACCCAAATCGCGTTGGATACCTGGCAAGCTAGAGTTATGTAGAGGTTAGCGG AATTCCTGTGAAGCGGTGGAATCGGTAGATATAAGGAAGAACCAATATGGCGAAGGAGCGTA ACTGGACATACACTGACACTGAGAGACGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTA GTCACGCCCTAAACGATGATCATTAGCTGATGGAAATTCATCGGGCAGCTAACGATTAATGA TCCGCTGAGTAGTACGTTCCGCAAGAATAAACTTAAAGGAATTGACGGGGATCCGCAAGCGG TGGAGCATGTGTTAATTTGAAGATACGGGTAAACCTTACCACCTCTTGACATCTCCGCAAGCT ATAGAGATATAGTGGAGTCAACGGAATGACAGATGGTGCATGTTGCTGCTGAGTCTGCTGTA GATGTTCCGTTAAGTCTGCAACGAGCGCAACCTTGTCTTATGTTACAGCATTAGTTGGGGA CTAAGGAGACTGCCCGAATTTGGGAGGAAAGTGGGGACGACGCTCAATCATCATGCTCTTACG AGTGGGGCTACACACGCTCAATGGATGTTGACAAAGAGAAAGCAAGCAAGTGTGAGGAGCAA CTCAAAAACACTTCTCAGTTCCGATTGTTGCTGCAACTCGAACATGAAGTCGGAATCGCTAG TAATCGTAGACAGCTACGCTACGGTGAATACGTTCTCGGCTTGTATACACCCCGCTCAAAACA TGGGAGCTGTTAATCCCGAAGTCCGTTTATAAACAACTGCCTAAGGCAGGACTGGTACTGGGT AAGTCGAGCACG</p> <p>Región intergénica (ISR)</p> <p>CGGTTTTATAACAACTGCCTAAGGCAGGACTGGTACTGGGTAAGTCGAGCACG</p> <p>CTTGACACCCGCGCTCAAACTGGGAGCTGGTAAATGCCGGAAGTCCGTTTATAAACAACTGC CTAAGGCAGGACTGGTACTGGGTTAAGTCTGTAACAGGTATCCCTACGAGAAGCTGGGATGG ATCACCTCCTTTCTAGCGAGTACAGAAAGCGCTATTTATAGGCTTAACTTATTATCAGACCTTA TTTTAAACGCTATGGCTTTTTAGGCTCAAAAAGCTTATATCTAGTTTTGAGAGAAACAACTC ATGTTCTTTGAAAACCTGAATAGTAAATTTTAAATATTTACAACGACATCAAAATAAATTTTGGT TAATTTGTTTTGATTCATCGAGTAAATCATATAACACATATGATTCTTGAATGCTCTAAAATACACAT CAATAACAACATAAACAATAGGAACATCTTTAAATAAGTAAGAGTTTGTGGTGGATGCCTTGGGT CTGAAAGTCGATGAAGGACGTGCAAA</p>	<p>96 % <i>Mycoplasma iners</i> strain 89R-D-3 FJ666133.1</p> <p>96 % <i>Mycoplasma columbinum</i> strain FG295 16S EU859979.1</p> <p>96 % <i>Mycoplasma sp. 72CL</i> partial 16S rRNA gene, strain 72CL. FM878039.1</p> <p>96 % <i>Mycoplasma sp. 34CL</i> partial 16S rRNA gene, strain 34CLAM182892.1</p>
	<p>Gen ARN Ribosómico 16 S</p> <p>TTGCAAGCGTTATCCGGGAATTATTGGCGTAAAGCGTCTGAGTTGTTGTTAAGTCTGGCGTCA AAATTTGGGGCTCAACCCAAATCGCGTTGGATACCTGGCAAGCTAGAGTTATGTAGAGGTTAGCGG AATTCCTGTGAAGCGGTGGAATCGGTAGATATAAGGAAGAACCAATATGGCGAAGGAGCGTA ACTGGACATACACTGACACTGAGAGACGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTA GTCACGCCCTAAACGATGATCATTAGCTGATGGAAATTCATCGGGCAGCTAACGATTAATGA TCCGCTGAGTAGTACGTTCCGCAAGAATAAACTTAAAGGAATTGACGGGGATCCGCAAGCGG TGGAGCATGTGTTAATTTGAAGATACGGGTAAACCTTACCACCTCTTGACATCTCCGCAAGCT ATAGAGATATAGTGGAGTCAACGGAATGACAGATGGTGCATGTTGCTGCTGAGTCTGCTGTA GATGTTCCGTTAAGTCTGCAACGAGCGCAACCTTGTCTTATGTTACAGCATTAGTTGGGGA CTAAGGAGACTGCCCGAATTTGGGAGGAAAGTGGGGACGACGCTCAATCATCATGCTCTTACG AGTGGGGCTACACACGCTCAATGGATGTTGACAAAGAGAAAGCAAGCAAGTGTGAGGAGCAA CTCAAAAACACTTCTCAGTTCCGATTGTTGCTGCAACTCGAACATGAAGTCGGAATCGCTAG TAATCGTAGACAGCTACGCTACGGTGAATACGTTCTCGGCTTGTATACACCCCGCTCAAAACA TGGGAGCTGTTAATCCCGAAGTCCGTTTATAAACAACTGCCTAAGGCAGGACTGGTACTGGGT AAGTCGAGCACG</p> <p>Región intergénica (ISR)</p> <p>CGGTTTTATAACAACTGCCTAAGGCAGGACTGGTACTGGGTAAGTCGAGCACG</p> <p>CTTGACACCCGCGCTCAAACTGGGAGCTGGTAAATGCCGGAAGTCCGTTTATAAACAACTGC CTAAGGCAGGACTGGTACTGGGTTAAGTCTGTAACAGGTATCCCTACGAGAAGCTGGGATGG ATCACCTCCTTTCTAGCGAGTACAGAAAGCGCTATTTATAGGCTTAACTTATTATCAGACCTTA TTTTAAACGCTATGGCTTTTTAGGCTCAAAAAGCTTATATCTAGTTTTGAGAGAAACAACTC ATGTTCTTTGAAAACCTGAATAGTAAATTTTAAATATTTACAACGACATCAAAATAAATTTTGGT TAATTTGTTTTGATTCATCGAGTAAATCATATAACACATATGATTCTTGAATGCTCTAAAATACACAT CAATAACAACATAAACAATAGGAACATCTTTAAATAAGTAAGAGTTTGTGGTGGATGCCTTGGGT CTGAAAGTCGATGAAGGACGTGCAAA</p>	<p>96 % <i>Mycoplasma iners</i> strain 89R-D-3 FJ666133.1</p> <p>96 % <i>Mycoplasma columbinum</i> strain FG295 16S EU859979.1</p> <p>96 % <i>Mycoplasma sp. 72CL</i> partial 16S rRNA gene, strain 72CL. FM878039.1</p> <p>96 % <i>Mycoplasma sp. 34CL</i> partial 16S rRNA gene, strain 34CLAM182892.1</p>
<p>Gen ARN Ribosómico 16 S</p> <p>TTGCAAGCGTTATCCGGGAATTATTGGCGTAAAGCGTCTGAGTTGTTGTTAAGTCTGGCGTCA AAATTTGGGGCTCAACCCAAATCGCGTTGGATACCTGGCAAGCTAGAGTTATGTAGAGGTTAGCGG AATTCCTGTGAAGCGGTGGAATCGGTAGATATAAGGAAGAACCAATATGGCGAAGGAGCGTA ACTGGACATACACTGACACTGAGAGACGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTA GTCACGCCCTAAACGATGATCATTAGCTGATGGAAATTCATCGGGCAGCTAACGATTAATGA TCCGCTGAGTAGTACGTTCCGCAAGAATAAACTTAAAGGAATTGACGGGGATCCGCAAGCGG TGGAGCATGTGTTAATTTGAAGATACGGGTAAACCTTACCACCTCTTGACATCTCCGCAAGCT ATAGAGATATAGTGGAGTCAACGGAATGACAGATGGTGCATGTTGCTGCTGAGTCTGCTGTA GATGTTCCGTTAAGTCTGCAACGAGCGCAACCTTGTCTTATGTTACAGCATTAGTTGGGGA CTAAGGAGACTGCCCGAATTTGGGAGGAAAGTGGGGACGACGCTCAATCATCATGCTCTTACG AGTGGGGCTACACACGCTCAATGGATGTTGACAAAGAGAAAGCAAGCAAGTGTGAGGAGCAA CTCAAAAACACTTCTCAGTTCCGATTGTTGCTGCAACTCGAACATGAAGTCGGAATCGCTAG TAATCGTAGACAGCTACGCTACGGTGAATACGTTCTCGGCTTGTATACACCCCGCTCAAAACA TGGGAGCTGTTAATCCCGAAGTCCGTTTATAAACAACTGCCTAAGGCAGGACTGGTACTGGGT AAGTCGAGCACG</p> <p>Región intergénica (ISR)</p> <p>CGGTTTTATAACAACTGCCTAAGGCAGGACTGGTACTGGGTAAGTCGAGCACG</p> <p>CTTGACACCCGCGCTCAAACTGGGAGCTGGTAAATGCCGGAAGTCCGTTTATAAACAACTGC CTAAGGCAGGACTGGTACTGGGTTAAGTCTGTAACAGGTATCCCTACGAGAAGCTGGGATGG ATCACCTCCTTTCTAGCGAGTACAGAAAGCGCTATTTATAGGCTTAACTTATTATCAGACCTTA TTTTAAACGCTATGGCTTTTTAGGCTCAAAAAGCTTATATCTAGTTTTGAGAGAAACAACTC ATGTTCTTTGAAAACCTGAATAGTAAATTTTAAATATTTACAACGACATCAAAATAAATTTTGGT TAATTTGTTTTGATTCATCGAGTAAATCATATAACACATATGATTCTTGAATGCTCTAAAATACACAT CAATAACAACATAAACAATAGGAACATCTTTAAATAAGTAAGAGTTTGTGGTGGATGCCTTGGGT CTGAAAGTCGATGAAGGACGTGCAAA</p>	<p>96 % <i>Mycoplasma iners</i> strain 89R-D-3 FJ666133.1</p> <p>96 % <i>Mycoplasma columbinum</i> strain FG295 16S EU859979.1</p> <p>96 % <i>Mycoplasma sp. 72CL</i> partial 16S rRNA gene, strain 72CL. FM878039.1</p> <p>96 % <i>Mycoplasma sp. 34CL</i> partial 16S rRNA gene, strain 34CLAM182892.1</p>	

Upupa epops	Región intergénica (ISR)	
	T41T	<p>86 % <i>Mycoplasma leonicaptivi</i> strain ATCC 49890 AY755603.1</p> <p>85 % <i>Mycoplasma canis</i> strain Skotti A FJ876261.1</p> <p>85 % <i>Mycoplasma edwardii</i> strain 04-3440 DQ377845.1</p>
	Región intergénica (ISR)	
	T65T	<p>86 % <i>Mycoplasma leonicaptivi</i> strain ATCC 49890 AY755603.1</p> <p>85 % <i>Mycoplasma canis</i> strain Skotti A FJ876261.1</p> <p>85 % <i>Mycoplasma edwardii</i> strain 04-3440 DQ377845.1</p>
Región intergénica (ISR)		
T93T	<p>84 % <i>Mycoplasma sp. CSL7529-conjunctiva</i> EU859984.1</p> <p>83% <i>Mycoplasma leonicaptivi</i> strain ATCC 49890AY755603.1</p> <p>83 % <i>Mycoplasma oxoniensis</i> AY781780.1</p>	
Región intergénica (ISR)		
T48T	<p>92 % <i>Mycoplasma gallopavonis</i> 16S-23S intergenic spacer, type strain WR1T. AJ780993.1</p> <p>91 % <i>Mycoplasma buteonis</i> strain Bb/T2g DQ847424.1</p> <p>85 % <i>Mycoplasma glycyphilum</i> AY729932.1</p> <p>88% <i>Mycoplasma corogypsi</i> 16S-23S intergenic spacer, type strain Bv1TAJ780989.1</p>	

A: Adenina.
C: Citosina.
G: Guanina.
T: Timina.
Y: T/C.
R: A/G.
W: A/T.

Alejandro Suárez Pérez

CHAPTER II

***MYCOPLASMA NEOPHRONIS* SP. NOV.,
ISOLATED FROM UPPER RESPIRATORY
TRACT OF CANARIAN EGYPTIAN VULTURE
(*NEOPHRON PERCNOPTERUS*
MAJORENSIS).**

Alejandro Suárez Pérez

II.1. INTRODUCTION

Alejandro Suárez Pérez

The Canary Islands possess the major biodiversity of European birds, however the loss of territory and the human pressure has led to many of these species to be on the verge of extinction. All the information obtained of these animals performs of vital importance for their conservation, especially in the case of the Canarian Egyptian vulture or “Guirre” (*Neophron percnopterus majorensis*).

The “Guirre” (*Neophron percnopterus majorensis*) is a unique and highly endangered subspecies of Egyptian Vulture found only in the eastern Canary Islands (Donázar *et al.*, 2002; Palacios *et al.*, 2002). Population has been estimated at 30 breeding pair (Palacios, 2004). This avian species is presently listed on the International Union for Conservation of Nature Red List of Threatened species as endangered. Causes of its decline are the loss of territory and the human pressure; changes in livestock managing including the regular use of veterinary drugs and intoxication by poison or lead ingestion (Lemus *et al.*, 2008).

Mycoplasmas have been previously isolated from vultures (Poveda *et al.*, 1990; 1994; Panangala *et al.*, 1993; Oaks *et al.*, 2004; Loria *et al.*, 2008; Ruder *et al.*, 2009; Lecis *et al.*, 2010) (Table 1) but their significance to health of these birds is unclear. A possible positive association between main avian bacterial pathogens like *Chlamydophila* and *Salmonella*, and *Mycoplasma spp.* has also been identified (Gangoso *et al.*, 2009).

In this chapter, we describe the isolation of six *Mycoplasma* strains (G.A., T80T, T157T, T185T, T186T and T331T) obtained from the trachea of six Canarian Egyptian vultures (*Neophron percnopterus majorensis*) apparently healthy.

We have followed the minimal standards for description of new species of the class *Mollicutes* (division *Tenericutes*, Order *Mycoplasmatales*) published by Brown *et al.* (2007).

The taxonomic description of new species within this group of pro-karyotes is complicated by their small size, fastidious and generally similar growth requirements, and especially by great reliance on detailed and laborious serologic analyses for species distinctions (*International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes*, 1995).

The mandatory requirements propose by the *International Committee on Systematics of Prokaryotes Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes* are:

- (1) Deposition of the type strain into two recognized culture collections, preferably located in different countries.
- (2) Deposition of the 16S rRNA gene sequence into a public database, and a phylogenetic analysis of the relationships among the 16S rRNA gene sequences of the novel species and its neighbours.
- (3) Deposition of antiserum against the type strain into a recognized collection.
- (4) Demonstration, by using the combination of 16S rRNA gene sequence analyses, serological analyses and supplementary phenotypic data that the type strain differs significantly from all previously named species.
- (5) Assignment to an order, a family and a genus in the class, with an appropriate specific epithet.

The recommend by Petterson *et al.* (2000) suggest that 16S rDNA sequence analysis to be used for characterization of a putatively new species and if it is found to group with the members of the *M. hominis* cluster, it should be sufficient to test that strain in serological analysis only against antisera of the members of this cluster and they suggest that sequence analysis of the 16S rRNA genes should be a strong recommendation for defining a new species within the mollicutes.

We find that the *mycoplasma* isolated from the Canarian Egyptian vultures (*Neophron percnopterus majorensis*) possesses distinctive characteristics that differentiate it from other previously classified mycoplasma species. We therefore propose the recognition of strains (G.A., T80T, T157T, T185T, T186T and T331T) as a new species in the genus *Mycoplasma*.

Table 1. Previous isolation from scavengers birds:

Author	Host	<i>Mycoplasma</i>	Pathogenesis
Poveda <i>et al.</i> , 1990b	<i>Aegypius monachus</i> .	<i>M. gallinarum</i> .	Histopathologic inflammatory change in the upper respiratory.
Panangala <i>et al.</i> , 1993	<i>Coroagyps atratus</i> .	<i>M. corogypsi</i> .	Footpad abscess.
Poveda <i>et al.</i> , 1994	<i>Gyps fulvus</i> .	<i>M. gypis</i> .	Respiratory disease.
Oaks <i>et al.</i> , 2004	<i>Gyps bengalensis</i> .	<i>M. vulturii</i> .	Died from apparent diclofenac intoxication.
Loria <i>et al.</i> , 2008	<i>Gyps fulvus</i> .	<i>M.gallinarum</i> .	Apparently healthy.
Ruder <i>et al.</i> , 2009	<i>Coroagyps atratus</i> .	<i>M. corogypsi</i>	Polyarthritis.
Lecis <i>et al.</i> , 2010	<i>Gyps fulvus</i> .	<i>M. unknown</i> .	Apparently healthy.

Alejandro Suárez Pérez

II.2. MATERIALS AND METHODS

Alejandro Suárez Pérez

The samples used in this study were taken from six Canarian Egyptian vultures or “Guirre” the same day of entry to the Cabildo’s Wildlife Recovery Centre in Tafira (Canary Islands, Spain). The causes of admission were electrocution (Guirre from which strain T80T was isolated), intoxication by poison (three different Guirre from which strains T157T, T185T, T186T were respectively isolated), malformation beak (one Guirre from which strain T331T was isolated) and an accident with an electricity pylon resulting in an injury to the leg (Guirre from which strain G.A. was isolated).

All samples were taken from the Guirre’s tracheas with sterile cotton swabs, the same day of entry to Cabildo’s Wildlife Recovery Centre in Tafira (Canary Island, Spain). All the samples were inoculated in liquid SP4 II medium (Ramírez *et al.*, 1997) containing 20% horse serum.

Inoculates were incubated at 37°C for 24 hours. After that the incubation, cultures were filtered through 0.45 µm pore size sterile membranes and plated onto liquid SP4 II medium agar. Agar plates were incubated at 37°C under aerobic conditions. Recovery and examination of cultures were performed as previously described (Bradbury *et al.* 1998).

Isolated *mycoplasma* strains were cloned three times (Tully, 1983) because a pure culture and cloning of *Mollicutes* species is essential for determinative studies (Brown *et al.*, 2007). The *mycoplasma* colonies grown on agar medium were examined with stereomicroscope after 2, 3, 4, and 5 days of incubation.

The cellular morphology of the organism was assessed by transmission electron microscopy of sectioned organism. For electron microscopy, (strain G.A.) harvested from SP4 II broth cultures was fixed in 2 % paraformaldehyde washes 0, 2 M Tris-buffered

saline; cells were post fixed with 1 % (w/v) osmium tetroxide. The fixed cells were sequentially dehydrated in graded dilutions of ethanol and then embedded in vinyl cyclohexane dioxide epoxy resin. Thin sections were collected on copper grids, stained with 10 % uranyl acetate in methanol and 0, 4 % lead citrate, and observed with electron microscope at 60 kV.

The requirement of sterol for growth was determined indirectly using the digitonin disc inhibition procedure by Poveda (1998b).

All strains were examined for metabolism of glucose and mannose, for hydrolysis of arginine and urea, for reduction of tetrazolium chloride (anaerobically). Film and spot production was tested on SP4 II medium agar (Poveda, 1998a). Positive and negative controls were used for all tests.

Strain G.A. was examined for hemoadsorption by using sheep erythrocytes (Gardella & Del Giudice, 1983). Hemadsorption is property that can be useful in mycoplasma identification and characterization.

We prepared cultures of the test and control organisms on plates of standard medium with a minimum of 40-60 well-separated colonies. Before use, harvest the red blood cells by centrifugation. We removed the supernatant, and resuspended the cells at a 10 % concentration in PBS. We prepared a 0. 5 % suspension of red blood cells in PBS, and add 1 ml onto the plates with colonies. It was incubated the plates for 30 min at 37°C. We removed the excess red blood cells suspension, and washed carefully with PBS inclining the plates. The plates were examined with a stereomicroscope to detect adsorption of red blood cells to single colonies.

The base composition of the DNAs was calculated using high-performance liquid chromatography (HPLC) as previously reported (Urdiain *et al*, 2008). About 10 µg of DNA of sample G.A. were diluted in a 15 µl volume of water. This sample was boiled for about 5 min and immediately ice chilled. To the denatured DNA mixture, 15 µl nuclease S1 (Roche) at 4 units/ml in hydrolysis buffer (33mM sodium acetate, 50mM NaCl, and 0.033mM ZnSO₄, pH 4.5) were added, and the solution was incubated for 1 h at 37°C. Following the DNA hydrolysis, 30 µl alkaline phosphatase at 2 units/ml (Promega) in dephosphorylation buffer (33mM Tris-HCl, pH 8.1) were added to the mixture and incubated for 2 h at 37°C.

Standards were prepared from commercial deoxynucleotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, PCR grade; Roche). Equimolar AT and GC mixtures at a final concentration of 1 nmol/ml for each nucleotide were used to prepare different standard G+C mole percentages (20–60%). Standards were treated the same as the DNA of sample G.A., but omitting the addition of the nuclease S1 enzyme.

The final hydrolysis mixtures of 60 µl were deproteinized by the addition of an equal volume of chloroform-isoamyl alcohol (24:1). After centrifugation (5 min at 13,000 rpm) the supernatants were collected and stored frozen until their injection in the HPLC.

Nucleoside mixtures were separated by reversed-phase chromatography using a C-18 column (Aventis) in a HPLC system (waters detector, PDA 2996), using a mobile phase of 0.1M (NH₄) H₂PO₄ pH4 with 5% acetonitrile (Panreac), at a flow rate of 1 ml/min. The chromatography was completed in 8–14 min.

The method of extraction of DNA used resulted from a modification of the large-scale extraction procedure by Marmur (1961).

Determination and analysis of partial 16S rRNA gene sequence.

The strain G.A. was designated as our reference for this work. It's almost complete 16 S gene sequence was determined as previously described by Johansson *et al.* (1998).

The new sequence with the accession number FR682077 was added to the updated and prealigned 16S rRNA gene database (LTP_s104, <http://www.arb-silva.de/projects/living-tree/>) compiling all sequences of all type strains for which an entry of high quality was found (Yarza *et al.*, 2010). The sequence was aligned by using the ARB software package (Ludwig *et al.*, 2004) (www.arb-home.de), and manually improved. All tree reconstructions were performed by using the RAxML algorithm version 7.0 with the GTRGAMMA model (Stamatakis, 2006) using subsets of data corresponding to the type strains of the genus. In all cases, the tree reconstructions were performed by using a sequence conservation filter of 40% for all *Bacteria* (Yarza *et al.*, 2010).

The mycoplasma DNA was extracted from swabs by swirling the swab in 1 ml of phosphate buffered saline, removing the swab, and then using the Genelute kit (Sigma).

A serological comparison of the strain G.A. with each other and a comparison with members of previously described *Mollicutes* species of *Hominis cluster* were performed by using Growth inhibition tests (GI) (Poveda & Nicholas, 1998). The GI test is used most frequently (Edward & Fitzgerald, 1954; Clyde, 1964, 1983; Black, 1973; Poveda & Nicholas, 1998).

We decided perform serological studies with all members of *Hominis* Cluster (**Table 2**) because the 16S rRNA gene sequences of species in the *hominis* cluster were found to be 94% similar. This consistency in phenotypic pattern has not been found in any of the other phylogenetic clusters of the *hominis* group (Petterson *et al.*, 2000).

The availability of 16S rRNA gene sequence data permits directed serological screening. It is usually necessary to test the strain only with antisera to species with 94 % 16S rRNA gene sequence similarity (Brown *et al.*, 2007).

Table 2. The species and strains with the following accession numbers were used as references in the phylogenetic analysis.

Mycoplasma hominis PG 21^A, *M. subdolum* TB^A, *M. orale* CH 19299^A, *M. indiense* 3 T^B, *M. faucium* DC – 333^A, *M. hyosynoviae* S 16^A, *M. salivarium* PG 20^C, *M. buccale* CH 20247^A, *M. anseris* 1219^A, *M. cloacale* 383^D, *M. arthritidis* PG 6^C, *M. equirhinis* M 432172^A, *M. phocidae* 105^A, *M. spumans* PG 13^A, *M. falconis* H/T1^B, *M. phocacerebrale* 1049^C, *M. gatae* CS^A, *M. arginini* G 230^A, *M. alkalescens* D 12 (PG 51)^A, *M. auris* U1A^B, *M. canadense* C 275^A and *M. gypis* B1/T1^A.

Abbreviations:

^A: Antiserum rabbit, Institute of Medical Microbiology, University of Aarhus, Denmark.

^B: Antiserum rabbits 14, 718. AJD Reference GM 623. ^C: Antiserum rabbit, Central Public Health Laboratory, Colindale LONDON NW95HT. ^D: NCTC 10199 RAS

Preparation of antigens and antiserum:

Materials: Culture of *mycoplasma* (strain G.A.), SP 4 II medium, phosphate buffered saline, pH 7.5, Freund's complete adjuvant, 22-gauge needles, vials for preparation and storage of antigen emulsion prior to injection and two rabbits.

Procedure: Antiserum to strain G.A. was prepared in rabbits using a standards technique (Senterfit, 1983). The *mycoplasma* (strain G.A.) was grown in 500 ml of SP 4 II medium and centrifuged at 25.000 *g* for 40-45 minutes. The supernatant fluid was discarded and washed the sediment pellet twice in 100 ml of phosphate-buffered saline (PBS), pH 7, 5. The final pellet was resuspended in 4 ml PBS and emulsified with an equal quantity of Freund's complete adjuvant.

We immunized both rabbits according to the following schedule:

- On day 0 injects 0.5 ml into each of four intramuscular sites on each rabbit (2 ml total/rabbit). Inject 0.2 ml intradermally into each of four sites on each rabbit (0.8ml/rabbit).
- On day 21, take a 1 ml blood sample from each rabbit as a test bleeding and give "booster" injections of 0.5 ml into each of four intramuscular sites on each rabbit.
- Test bleeds each animal on days 28, 35 and 42. Test the rabbit serum obtained from each bleeding by the serological procedure of your choosing. When sufficient antibody has developed in the rabbits, they may be bled, and the serum separated and stored at -80°C for long periods.

SDS PAGE: The protein samples were run in 10% polyacrylamide gels, and subjected to SDS PAGE (Laemmli, 1970) on a Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad), according to the manufacturer's instructions. Gels were then stained with Coomassie R-250 and destained with 40% methanol and 10% acetic acid to eliminate background.

Alejandro Suárez Pérez

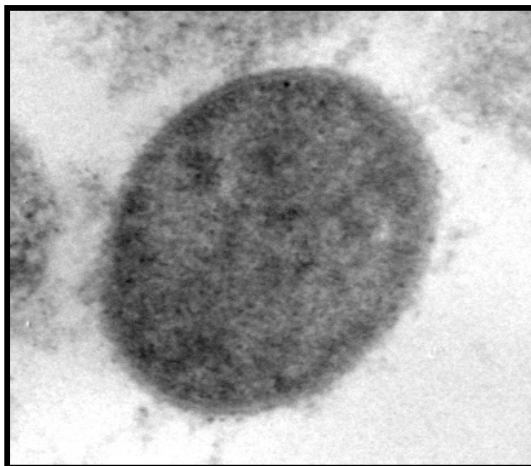
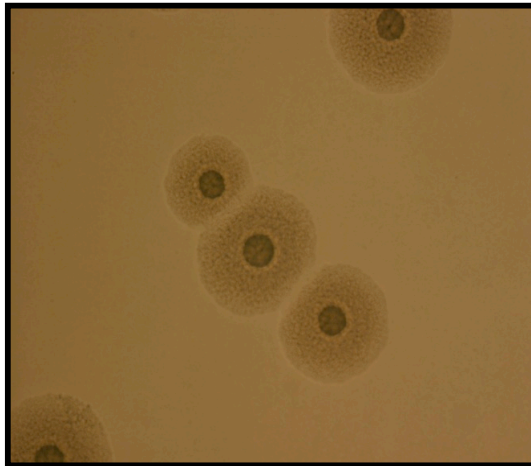
II.3. RESULTS AND DISCUSSION

Alejandro Suárez Pérez

Figure 2.3 Typical fried egg morphology of colonies of a mycoplasma strain *Cephalogasteridium* A. isolated from Egyptian culture. Note the presence of a bilaminar membrane and absence of a cell wall.

II.3.1. Morphology and ultra structure.

Colonies of strains G.A., T80T, T157T, T185T, T186T and T331T were easily visible on agar under a stereo microscope within 3 days of incubation at 37°C and had a typical “fried-egg” appearance at x 4 magnification (**Figure 2**). Ultrathin sections revealed the trilaminar structure of the cells membrane and the absence of a cell wall (**Figure 3**).



Strain (G.A.) was deposited into the American Type Culture Collection (ATCC®) and into Deutsche Sammlung von Mikroorganismen undl Zellkulturen (DSM) from Germany. The antiserum of strain (G.A.) was deposited against into *Mollicutes* Collection in University St. Indiana from USA.

II.3.2. Growth characteristics.

The organisms grew well at 37°C and the concentration in broth containing 20% horse serum.

II.3.3. Sterol requirement.

Growth was inhibited in the presence of 1. 5 % digitonin (zones of inhibition ranged from 6 to 10 mm), indicating a biochemical requirement for sterols characteristic of member of the *Mycoplasmatales* and not *Acholeplasmatales* (Poveda, 1998).

II.3.4. Biochemical characteristics.

All of the strains (G.A., T80T, T157T, T185T, T186T and T331T) hydrolyze arginine, did not fermented glucose and manose, did not reduced tetrazolium chloride, did not hydrolyze urea and did not produce films and spots.

II.3.5. Hemadsorption

The organisms not adsorbed sheep erythrocytes.

II.3.6. DNA base composition.

The G+C contents of strain G.A. were 31 mol%.

II.3.7. Partial 16S rRNA gene sequence.

Based on sequence analyses, (strain G.A.) was found to be:

- 98 % related to *Mycoplasma spumans* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S rRNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence.
- 97 % *Mycoplasma phocicerebrale* (strain CSL 5195S2) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence.
- 97 % *Mycoplasma canadense* (strain 466) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence
- 97 % *Mycoplasma arginini* (strain 284F08) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
- 97 % *Mycoplasma auris* (strain UIA) 16S ribosomal RNA, partial sequence.
- 97 % *Mycoplasma alkalescens* (strain PG51) 16S ribosomal RNA, partial sequence.
- 97 % *Mycoplasma falconis* (strain H/T1 16S) ribosomal RNA, partial sequence.
- 96 % *Mycoplasma phocidae* (strain C264-NAS) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence.

- 96 % *Mycoplasma equirhinis* (strain M432/72) 16S ribosomal RNA, partial sequence.
- 96 % *Mycoplasma anseris* (strain 1219) 16S ribosomal RNA, partial sequence.
- 96 % *Mycoplasma hominis* (strain PG21), chromosome, complete genome.
- 96 % *Mycoplasma cloacale* (strain 383) 16S ribosomal RNA, partial sequence.
- 96 % *Mycoplasma arthritidis* (strain 158L3-1), complete genome.
- 95% *Mycoplasma buccale* (strain CH20247 16S) ribosomal RNA, partial sequence.
- 95 % *Mycoplasma salivarium* (strain MP1166) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence.

The 16S rRNA gene nucleotide sequence of strain G.A. determined in this work has been deposited in the GeneBank database (FR682077.1).

The tree (**Figure 4**) shows a subtree of a larger reconstruction based on all species of the genus available in the release LTP_s104. G.A. clearly affiliated within the *M. hominis* cluster (Pettersson *et al.*, 2000), a group of sequences that formed a coherent clade with a divergence <90 % identity with the closest relatives outside the cluster, and from the taxonomic point of view a putative new genus within the family (Yarza *et al.*, 2008).

Strain G.A. showed to be most similar to *M. spumans* and *M. falconis* (Poveda *et al.*, 1994) with 98 % and 97 % sequence identity respectively.

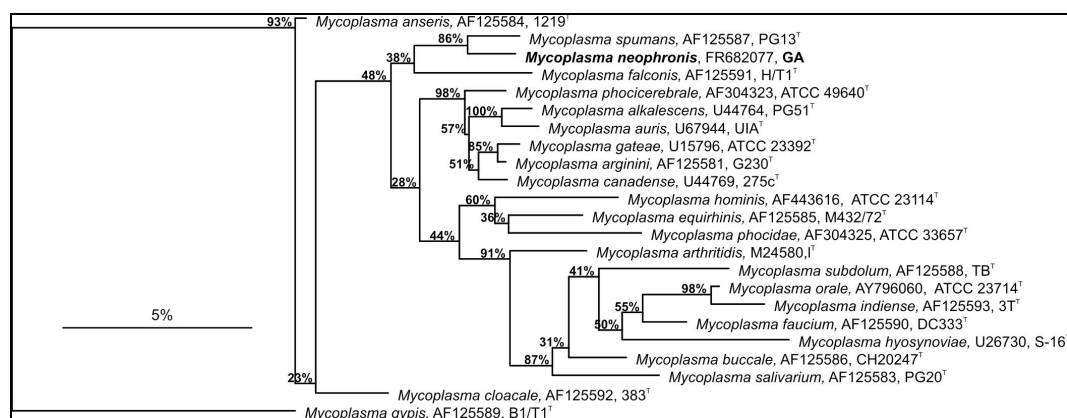


Figura 4: Phylogenetic reconstruction showing the affiliation of *Mycoplasma neophronis* strain G.A. based on the almost complete 16S rRNA gene. The tree shown is a subtree resulting from a complete maximum likelihood reconstruction using all the species of the genus. Numbers in the tree indicate the bootstrap values as a reflect of the branch stability. The bar indicates 5% sequence divergence.

The intergenic spacer region ISR of all isolates was amplified using the forward primer, 5'-CGT TCT CGG GTC TTG TAC AC-3' and the reverse primer, 5'-CGC AGG TTT GCA CGT CCT TCA TCG-3' following the same conditions as described before by (Ramírez *et al.*, 2008). The intergenic spacer region ISR has been demonstrated to be of higher resolutive power as that of the 16S rRNA gene (Harasawa, 1999).

The sequences of all strains resulted identical in accordance with their high phenotypic resemblance and the GenBank accession number for the intergenic spacer region are **GA** = HE572620, **T80T** = HE572625, **T157T** = HE572621, **T185T** = HE572622, **T186T** = HE572623 and **T331T** = HE572624.

Table 3. Matrix similarity score with the *Mycoplasma neophronis* strain G.A.

Species	<i>M. spumans</i>	<i>M. neophronis</i>	<i>M. falconis</i>	<i>M. phocicerebrale</i>	<i>M. alkalescens</i>	<i>M. auris</i>	<i>M. gateae</i>	<i>M. arginini</i>	<i>M. canadense</i>	<i>M. hominis</i>	<i>M. phocidae</i>	<i>M. arthritis</i>	<i>M. subdolum</i>	<i>M. orale</i>	<i>M. indiense</i>	<i>M. faucium</i>	<i>M. hyosynoviae</i>
<i>M. neophronis</i>	98,6																
<i>M. spumans</i>		98,6															
<i>M. falconis</i>	97,3	97,1															
<i>M. phocicerebrale</i>	97,4	97,6	96,8														
<i>M. alkalescens</i>	96,9	97,2	96,3	98,4													
<i>M. auris</i>	97	97,3	96,3	98,2	99												
<i>M. gateae</i>	97,1	97,2	96,7	99	98,5	98,2											
<i>M. arginini</i>	97,2	97,3	96,7	98,9	98,6	98,4	99,5										
<i>M. canadense</i>	97,1	97,2	96,5	98,7	98,7	98,6	98,9	99,2									
<i>M. hominis</i>	96,2	96,4	96,2	96,7	96,2	96,3	96,3	96,2									
<i>M. equirhinis</i>	96,6	96,9	96,2	97	96,4	96,7	96,4	96,8	96,6	97,4							
<i>M. phocidae</i>	96,9	96,4	95,6	96,4	96,6	96,4	96,3	96,4	96,6	96,4	97						
<i>M. arthritis</i>	95,8	95,9	95,4	96,8	97	96,6	97	97	96,8	95,8	96,4	95,9					
<i>M. subdolum</i>	95,1	95,1	95,3	95,9	95,4	95,6	95,6	95,8	95,6	95,2	95,2	94,2	96,1				
<i>M. orale</i>	94,9	94,9	94,9	95,6	95,3	95,2	95,3	95,4	95,5	95	95,4	94,7	96,4	96,6			
<i>M. indiense</i>	94,4	94,1	94,4	94,9	94,5	94,6	94,6	94,6	94,7	94,4	94,8	93,9	96	95,9	99		
<i>M. faucium</i>	95,1	95,2	95,3	95,9	95,7	95,7	95,9	95,9	95,8	95,3	96	95,1	96,9	97,4	98,2	97,5	
<i>M. hyosynoviae</i>	94,6	94,7	94,3	95	95,3	95,3	94,9	95	95,2	94,4	95,1	94,7	95,7	95,8	96,7	96,7	97

Minimum: 93.939394
 Maximum: 100.000000
 Average: 19.000000

II.3.8. Protein pattern by gel electrophoresis.

In addition, we studied their whole cell protein profiles to proof their phenotypic similarities. All strains isolated from Canarian Egyptian vulture or Guirre showed similar protein profiles (**Figure 5**).

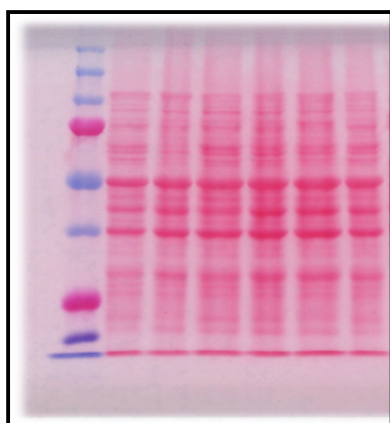


Figure 5: SDS PAGE profiles of whole extract proteins of the six strains isolated in this study. The lane order is as follows: (1): G.A., (2): T80T, (3): T157T, (4): T185T, (5): T186T, (6): T331T.

II.3.9. Serological test.

No growth inhibition by heterologous antisera was observed in the growth inhibition test with a panel of antiserum against *Hominis Cluster*, antiserum.

Alejandro Suárez Pérez

II.4. TAXONOMIC ASSIGNMENT

Alejandro Suárez Pérez

Mycoplasma neophronis (ne.o.phro'nis. N.L. gen. n. nephronis, of Neophron, isolated from Canarian Egyptian Vulture (*Neophron percnopterus majorensis*). The properties described above for strain G.A. fulfil the criteria Revised minimal for species descriptions of members of the class *Mollicutes*. A cell wall is absent and the cells can be filtered through 450 nm pore-size membranes. The G+C content of the strain G.A. was 31 mol%. All strains are resistant to penicillin and produce the typical fried-egg colonies on solid media. Arginine is hydrolyzed but glucose and manose are not fermented, there is no production of films and spots and there are no hemadsorption bysheep erythrocytes. Growth is inhibited by digitonin and requires serum or sterol for growth. The inability of the strains to hydrolyze urea mandates assignment to the genus *Mycoplasma*. Finally it contains conserved mycoplasmal genus-specific sequences in the 16S rRNA gene and is serologically distinct from other *Mycoplasma* species. The pathogenicity of this organism is not fully demonstrated. Type strain is G.A. (=ATCC BAA-2157) and (=DSM 24097) and the GenBank accession number for the 16S rDNA gene sequence is (FR682077).

Alejandro Suárez Pérez

II.5. ANNEXES

Alejandro Suárez Pérez



Confirmation of the availability of a strain for the purpose of valid publication of a new name according to the Bacteriological Code

The following information is confidential and serves only to allow the International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology to confirm that a strain has been deposited and will be available from the DSMZ in accordance with the Rules of the Bacteriological Code (1990 revision) as revised by the ICSP at the plenary sessions in Sydney and Paris.

"Mycoplasma neophroni" strain **G.A.** has been deposited in the DSMZ under the number

DSM 24097

This strain is available in the publicly accessible section of the DSMZ and restrictions have not been placed on access to information concerning the presence of this strain in the DSMZ. It will be included in published and online catalogues after publication of this number by the authors

This strain has been checked for viability in the DSMZ and is stored using one of the standard methods used in the DSMZ

The depositor of this strain has also carried out a "depositor's check" and confirmed the identity of the strain held under this DSM number

Dr. S. Gronow



BACTERIOLOGY PROGRAM

A global bioscience nonprofit
Organization dedicated to biological
Standards and biodiversity

American Type Culture Collection
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209 USA
Internet <http://www.atcc.org>

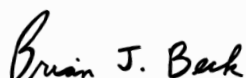
CERTIFICATE OF DEPOSIT

March 21, 2011

Mycoplasma neophroni (ATCC BAA-2157) was deposited in ATCC's general bacteriology collection by Alejandro Suarez-Perez; IUSA-ULPGC; Trasmontana S/N, Arucas, Gran Canaria, Canary Islands, Spain; on October 11, 2010.

The strain was confirmed to be viable and pure. The genotypic/phenotypic characteristics of this strain were determined to be consistent with those provided by the depositor.

The strain is stored in the collection and can be requested using the ATCC collection number. Information on the strain can be accessed through our website at www.atcc.org.



Brian J. Beck, Ph.D.
Bacteriology Program Manager
American Type Culture Collection (ATCC)
10801 University Boulevard
Manassas, VA 20110-2209

CONCLUSIONES

Alejandro Suárez Pérez

1. La caracterización genotípica y fenotípica permitió la identificación del 11 % de los micoplasmas aislados. De acuerdo con los resultados obtenidos, nueve cepas fueron identificadas como *Mycoplasma falconis*, una como *Mycoplasma iowae*, seis como *Mycoplasma columbinum* y dos como *Mycoplasma columborale*. El resto de aislamientos, el 89 %, solo pudo identificarse como cepas del Género *Mycoplasma* spp.
2. Los medios de cultivo SP4-II y PH resultaron eficaces para el aislamiento primario de micoplasmas a partir de muestras procedentes de aves silvestres, como así lo demuestra el alto porcentaje de aislamientos obtenidos en este estudio, en el que se observó un mayor número de micoplasmas en el tracto respiratorio superior (tráquea y coana) que en las muestras tomadas en la cloaca.
3. Las pruebas bioquímicas y la técnica de electroforesis de proteínas (SDS PAGE) han ayudado a la identificación de bacterias del género *Mycoplasma* agrupando las cepas en función de los perfiles observados, lo que simplificó en buena medida la tipificación de un alto número de aislamientos.
4. Los resultados observados tras el uso de la técnica DGGE a partir de ADN extraído de medios de cultivo con crecimiento puro de micoplasmas han revelado que esta prueba facilita significativamente los estudios epidemiológicos con estas bacterias en aves silvestres. En este sentido, las similitudes de los perfiles observados con esta técnica a partir de ADN de micoplasmas aislados en la misma especie aviar coinciden con los resultados observados en otras pruebas fenotípicas y genotípicas, con lo que se reduce considerablemente el número de

técnicas identificativas en este tipo de estudios. Por otro lado, la técnica DGGE permite estudiar la diversidad de micoplasmas de una muestra, ya que es capaz de detectar cultivos mixtos de forma rápida y favorecer el procesado de una gran cantidad de aislamientos sin necesidad de esperar al crecimiento de los mismos.

5. El uso de la prueba de inhibición de crecimiento es muy útil para confirmar los resultados obtenidos en las pruebas preliminares, pero la escasa disponibilidad de antisueros en los laboratorios y la lenta adaptación de las cepas a los medios de cultivo son factores limitantes en la identificación de micoplasmas en aves silvestres.
6. El estudio del gen ARNr 16S resultó de gran utilidad en las investigaciones taxonómicas de micoplasmas aislados en aves silvestres. Sin embargo, al tratarse de hospedadores distintos a los domésticos, se hacen necesario utilizar otros métodos moleculares que aporten información adicional de las relaciones filogenéticas.
7. El estudio de la región intergénica (ISR) es una herramienta importante en investigaciones taxonómicas con muchos aislamientos de micoplasmas y puede ser muy útil en la comparación de especies y subespecies estrechamente relacionadas filogenéticamente.
8. *Mycoplasma iowae* ha sido aislado en la especie *Burhinus oedicnemus* (alcaraván común). Por lo tanto, dicha especie podría actuar como reservorio de esta bacteria y constituye una posible fuente de infección para las aves domésticas. La ausencia de aislamientos de otros micoplasmas considerados

patógenos implica que las aves silvestres estudiadas en esta Tesis Doctoral no actúan como reservorios de los mismos .

9. Las diferencias observadas en el número de micoplasmas aislados en diferentes especies aviarias es un indicador claro de la salud de estos animales, y se observa un mayor número de aislamientos en aquellas especies que mantienen un estrecho contacto con las actividades humanas.
10. Un grupo de cepas aisladas en la especie *Neophron percnopterus majorensis* (Alimoche canario) ha sido descrito como una nueva especie del género *Mycoplasma*, denominándose *Mycoplasma neophronis*.
11. Los resultados observados con las técnicas realizadas en esta Tesis Doctoral no revelan una relación especie específica entre los micoplasmas y las aves silvestres, ya que se han identificado micoplasmas con un alto grado de homología en aves pertenecientes a taxones heterogéneos.
12. Aunque la mayoría de los aislamientos solo fue identificado hasta el nivel de género, es muy probable que muchos de ellos sean especies nuevas no descritas hasta el momento, por lo que para su caracterización final será preciso realizar estudios posteriores, que apliquen todas las pruebas recomendadas por el Subcomité de Taxonomía de *Mollicutes*.

Alejandro Suárez Pérez

BIBLIOGRAFÍA

Alejandro Suárez Pérez

1. **Adler, H.E. & Yamamoto, R. (1957).** Pathogenic and non-pathogenic pleuropneumonia-like organisms in infectious sinusitis of turkeys. *American Journal of Veterinary Research* **18**, 655-656.
2. **Adler, H.E., Fabricant, J., Yamamoto, R. & J. Berg. (1958).** Isolation and identification of pleuropneumonia-like organisms of avian origin. Symposium on chronic respiratory diseases of poultry. *American Journal of Veterinary Research* **19**, 440-447.
3. **Al-Ankari, Abdul-Rahman & Bradbury, J. M. (1996).** *Mycoplasma iowae*: A review. *Avian Pathology* **25**, 205-229.
4. **Amin, M. M. (1977).** Avian mycoplasma: studies on isolation, infection and control University of Liverpool — PhD Thesis.
5. **Anderson, R.M. & May, R.M. (1979).** Population biology of infectious diseases. *Nature* **280**, 361-367.
6. **Assunção, P., Machado, M.P., Ramírez, A.S., Rosales, R.S., Antunes, N.T., Poveda, C., Fe, C.D. & Poveda, J.B. (2007).** Prevalence of pathogens in great white pelicans (*Pelecanus onocrotalus*) from the Western Cape, South Africa. *Journal Appl. Animal Research* **32**, 29-32.
7. **Astorga, R.J., Cubero, M.J., León, L., Maldonado, A., Arenas, A., Tarradas M.C. & Perea, A. (1994).** Serological survey of infectious in waterfowl in the Guadalquivir Marshes (Spain). *Avian Diseases* **38**, 371-375.

8. **Atschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Miller, W. & D.J. Lipman. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389-3402.
9. **Baseman, J.B. & Tully, J.G. (1997).** Mycoplasmas: Sophisticated, Reemerging, and Burdened by their Notoriety. *Emerging infectious Diseases* **3**, 21-32.
10. **Bencina, D., Dorrer, D. & Tadina, T. (1987a).** Mycoplasma species isolated from six avian species. *Avian Pathology* **16**, 653-664.
11. **Bencina, D., Mrzel, I., Tadina, T. & Dorrer, D. (1987b).** Mycoplasma species in chicken flocks with different management systems. *Avian Pathology* **16**, 599-608.
12. **Bencina, D., Mrzel, I., Rojs, O.Z., Bidovec, A. & Dovc, A. (2003).** Characterisation of *Mycoplasma gallisepticum* strains involved in respiratory disease in pheasants and peafowl. *Veterinary Record* **152**, 230-234.
13. **Black, F. T. (1973).** Modification of the growth inhibition test and its application to human T-mycoplasmas. *Application in Microbiology* **25**, 528-533.
14. **Bolske, G. & Morner, T. (1981).** Isolation of a *Mycoplasma* spp. from three Buzzards (*Buteo* spp). *Avian Diseases* **26**, 406-411.
15. **Botes, A., Peyrot, B.M., Olivier, A.J., Burger, W.P. & Bellstedt, D.U. (2005).** Identification of three novel *mycoplasma* species from ostriches in South Africa. *Veterinary Microbiology* **111**, 159-169.

16. **Bozeman, L.H., Kleven, S.H. & Davis, R.B. (1984).** *Mycoplasma* challenge studies in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) and chickens. *Avian Diseases* **28**, 426-434.
17. **Bozimowsk, D., Artiss, J.D. & Zak, B. (1983).** Spectrophotometric comparison of several reactions used for cerebrospinal fluid protein determinations. *Microchemical Journal* **23**, 285-293.
18. **Bradbury, J.M. (1998).** Recovery of Mycoplasmas from Birds. In *Methods in Molecular Biology*, Vol. 104, pp. 45–52. Edited by Miles and Nicholas. Totowa, NJ: Humana Press Inc.
19. **Bradbury, J.M. (1999).** Turkey mycoplasmas revisited. Proceedings of the 2nd International Symposium on Turkey Diseases. Berlin, Germany, March 24 to 27, 1999. pp: 18-122.
20. **Bradbury, J.M. & Forrest M. (1984).** *Mycoplasma cloacale*, a New species Isolated from a Turkey. *International Journal of Systematic Bacteriology* **34**, 389-392.
21. **Bradbury, J.M. & Kleven, S.H. (2008).** *Mycoplasma iowae* infection. In Y.M. Saif, A.M. Fadly, J.R. Glisson, L.R. McDougald, L.K. Nolan & D.E. Swayne (Eds.). *Diseases of Poultry* 12th edn (pp. 856-862). Ames, IA: Blackwell Publishing.
22. **Bradbury, J.M., Ideris, A. & Oo, T.T. (1988a).** *Mycoplasma iowae* infection in young turkeys. *Avian Pathology* **17**, 149-171.

23. **Bradbury, J.M., Jordan, F.T.W., Shimizu, T., Stipkovitis, L. & Varga, Z. (1988b).** *Mycoplasma anseris* sp. Nov. Found in Geese. *International Journal of Systematic Bacteriology* **38**, 74-76.
24. **Bradbury, J.M., Forrest, M. & Williams's, A. (1983).** *Mycoplasma lipofaciens*, a new species of avian origin. *International Journal Systematic Bacteriology* **33**, 329-35.
25. **Bradbury, J.M., Saed Abdul-Wahab, O.M., Yavari, C.A., Dupiellet, J. & Bové, J.M. (1993).** *Mycoplasma imitans* sp. Nov. Is Related to *Mycoplasma gallisepticum* and Found in Birds. *International Journal of Systematic Bacteriology* **43**, 721-728.
26. **Bradbury, J.M., Vuillaume, A., Dupiellet, J.P., Forrest, M., Bind, J.L. & Gaillard-Perrin, G. (1987).** Isolation of *Mycoplasma cloacale* from a number of different avian hosts in Great Britain and France. *Avian Pathology* **16**, 183-186.
27. **Brown, D. R., Whitcomb, R. F. & Bradbury, J.M. (2007).** Revised minimal standard for novel mollicutes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**, 2703-2719.
28. **Buntz, B., Bradbury, J.M., Vuillaume, A. & Rousselot-Paillet. (1986).** Isolation of *Mycoplasma gallisepticum* from geese. *Avian Pathology* **15**, 615-617.

29. **Candela, M.G., Gonzalo, B., Sallent, A. & León, L. (2008).** Microbiological survey for selected bacterial pathogens in European storm petrel (*Hydrobates pelagicus*, Linnaeus 1758) from Grosa Island (Murcia, Southeastern Spain). *European Journal Wildl Research* **54**, 373-377
30. **Chalker, V.J. & Brownlie, J. (2004).** Taxonomy of the canine Mollicutes by 16S rRNA gene and 16S/23S rRNA intergenic spacer region sequence comparison. *International Journal of Systematic and Evolutionary and Microbiology* **54**, 537-542.
31. **Chalker, V.J., Owen, W.M.A., Paterson, C.J.I. & Brownlie, J. (2004).** Development of a polymerase chain reaction for the detection of *Mycoplasma felis* in domestic cats. *Veterinary Microbiology* **100**, 77-82.
32. **Chalquest, R.R., & Fabricant, J. (1960).** Pleuropneumonia-like organisms associated with synovitis in fowls. *Avian Diseases* **4**, 515-539.
33. **Chin, R.P., & Goshgarian, M. (2001).** Infraorbital sinusitis associated with *Pasteurella multocida* in pen-raised ring-necked pheasants. *Avian Diseases* **45**, 540-543.
34. **Christensen, N.H., Yavari, C.A., McBain, A.J. & Bradbury, J.M. (1994).** Investigations into the survival of *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma iowae* on materials found in the poultry house environment. *Avian Pathology* **23**, 127-143.
35. **Chu, H.P. (1958).** Differential diagnosis and control of respiratory diseases of poultry. *Veterinary Record* **70**, 1064-1078.

36. **Cleaveland, S.C., Laurenson, M.K. & Taylor, L.H. (2001).** Diseases of human and their domestic mammals; pathogens characteristics, host range and the risk of emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society* **356**, 991-999.
37. **Clyde, W.A. (1964).** Mycoplasma species identification based upon growth inhibition by specific antisera. *Journal of Immunology* **92**, 958-965.
38. **Clyde, W.A. (1983).** Growth inhibition tests. In *Methods in Mycoplasma*, vol. 1, pp. 405–410. Edited by S. Razin & J. G. Tully. New York: Academic Press.
39. **Cobb, D.T., Ley, D.H., & Doerr, P.D. (1992).** Isolation of *Mycoplasma gallopavonis* from Free-ranging Wild Turkeys in Coastal North Carolina Seropositive and Culture-negative for *Mycoplasma gallisepticum*. *Journal of Wildlife Diseases* **28**, 105-109.
40. **Colwell, R.R. (1970).** Polyphasic taxonomic of bacteria. In *Culture collections of Microorganisms* pp. 421-436. Edited by Iizuka, H and Hasegawa, T. Tokyo. University of Tokyo Press.
41. **DaMassa, A.J., Wakenell, P.S. & Brooks, D.L. (1992).** Mycoplasmas of goats and sheep. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation* **4**, 101-113.
42. **Daszak, P., Cunningham, A.A. & Hyatt, D. (2000).** Emerging infectious diseases of wildlife-threats to biodiversity and human health. *Science* **287**, 443-450.

43. **De Castro, M.D. (2008).** “La Naturaleza en peligro”. Editado por Temas de hoy. Madrid.
44. **De la Plane, J.P., & Stuart, H.O. (1943).** The propagation of a virus in embryonated chicken eggs causing C.R.D. in chickens. *American Journal of Veterinary Research* **4**, 325-332.
45. **Dhondt, A.A., Tessaglia, D.L. & Slothower, R.L. (1998).** Epidemic mycoplasmal conjunctivitis in house finches from eastern North America. *Journal of Wildlife Diseases* **34**, 265-280.
46. **Donázar, J.A., Negro, J.J., Palacios, C.J. & Gangoso, L. (2002).** Description of a new subspecies of the Egyptian vulture (*Accipitridae: Neophron percnopterus*) from the Canary Islands. *Journal Raptor Research* **36**, 17-23.
47. **Dupiellet, J.P. (1984).** *Mycoplasmes et acholeplasmes des palmipedes afoie gras: isolement, caracterisation, etude du role dans la pathologie , apport de D.E.A. de Pathologie .* Universite de Bordeaux II, Villenave d'Ornon, France.
48. **Edward, D.G. & Fitzgerald, W.A. (1954).** Inhibition of growth of pleuro-pneumonia-like organisms by antibody. *Journal Pathology Bacteriology* **68**, 23-30.
49. **Edward, D.G. & Kanarek, A.D. (1960).** Organism of the pleuropneumonia group of avian origin: Their classification into species. *Annals of the New York Academy of Sciences* **79**, 696-702.

50. **Ebert, D., Zschokke-Rohringer, C.D. & Carius, H.J. (2000).** Dose effects and density-dependent regulation of two microparasites of *Daphnia magna*. *Oecologia* **122**, 200-209.
51. **Esposito, J.F. (2000).** Respiratory medicine in pigeons. *Veterinary Clinics of North America. Exotic Animal Practice* **3**, 395-397.
52. **Erdélyi, K., Tenk, M. & Dán, A. (1999).** Mycoplasmosis Associated Perosis Type Skeletal Deformity in a Saker Falcon Nestling in Hungary. *Journal of Wildlife Diseases* **35**, 586-590.
53. **Fischer, S.G. & Lerman, L.S. (1983).** DNA Fragments Differing by Single Base-Pair Substitutions are Separated in Denaturing Gradient Gels: Correspondence with Melting Theory. *PNAS* **80**:1579-1583.
54. **Fischer, J.R., Stallknecht, D.E., Luttrell, M.P., Dhondt, A.A. & Converse, K.A. (1997).** Mycoplasmal conjunctivitis in wild songbirds: The spread of a new contagious disease in a mobile host population. *Emerging Infectious Diseases* **3**, 69-72.
55. **Frasca, S., Hinckley, I., Forsyth, M.H., Gorton, T.S., Geary, S.J. & Van Kruiningen, H.J. (1997).** Mycoplasmal Conjunctivitis in a European Starling. *Journal of Wildlife Diseases* **33**, 336-339.
56. **Frasca, S., Weber, E.S., Urquhart, H., Liao, X., Gladd, M., Cecchini, K., Hudson, P., May, M., Gast, R.J., Gorton, T.S., & Geary, S.J. (2005).** Isolation and Characterization of *Mycoplasma sphenisci* sp.nov. from the Choana of an Aquarium-Reared Jackass Penguin (*Spheniscus demersus*). *Journal of Clinical Microbiology* **43**, 2976-2979.

57. **Fraser, C.M., Gocayne, J.D., White, O., Adams, M.D., Clayton, R.A., Fleischmann, R.D., Bult, C.J., Kerlavage, A.R., Sutton, G., Kelley, J.M., et al. (1995).** The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* **270**, 397-403.
58. **Freundt, E.A. (1955).** The classification of the pleuropneumonia group of organism (Borreliomycetales). *Int. Bull. Bacteriology Nomencl. Taxon.* 5, 67-68.
59. **Freundt, E.A. (1957).** Mycoplasmatales. In *Bergey's Manual determinative bacteriology*. 7 th, pp. 914-926. Edited by Breed, R.S., Murray, E.G.D. and Smith, N.R. Baltimore. Willians and Wilkens Company. Baltimore.
60. **Freundt, E.A. (1974).** Mycoplasmatales. In *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. Vol 8, pp.930-955. Edited by Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons. Baltimore. Willians and Wilkens Company.
61. **Freundt, E.A. & Razin, S. (1983).** Genus I Mycoplasma. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 9, pp. 742-770. Edited by Krieg N. R. and J.G. Holt. Baltimore. Willians and Wilkins Co.
62. **Freundt, E.A., Andrews, B.E., Erno, H., Kunze, M. & Black, F.T. (1973.)** The sensitivity of *Mycoplasmatales* to sodiumpolyanetholsulfonate and digitonin. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig. Reihe A* 225: 104-112.
63. **Forrest, M. & Bradbury, J.M. (1984).** *Mycoplasma glycyphilum*, a new species of avian origin. *Journal of General Microbiology* **139**, 597-603.

64. **Forsyth, M. H., Tully, J. G., Gorton, T. S., Hinckley, L., Frasca, JR. Van Kruijningen, H.J. & Geary, S. J. (1996).** *Mycoplasma sturni* sp. nov., from the Conjunctiva of a European Starling (*Sturnus vulgaris*). *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**, 716-719.
65. **Fox, G.E., Stackebrandt, E., Hespell, R.B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T.A., Wolfe, R.S., Balch, W.E., Tanner, R.S., Magrum, L.J., Zablen, L.B., Blakemore, R., Gupta, R., Bonen, L., Lewis, B.J., Stahl, D.A., Luehrsen, K.R., Chen, K.N., & Woese, C.R. (1980).** The phylogeny of prokaryotes. *Science*. **209**, 457-463.
66. **Gangoso, L., Grande, J. M., Lemus, J. A., Blanco, G., Grande, J., & Donázar, J. (2009).** Susceptibility to Infection and Immune Response in Insular and Continental Populations of Egyptian Vulture: Implications for Conservation. *PLoS ONE* **4**(7): e6333. Doi: 10.131371/journal.pone00063333.
67. **Gardella, R.S. & Del Giudice, R.A. (1983).** Hemagglutination, hemadsorption and hemolysis. *Methods in Mycoplasmaology*, vol. 1, pp. 379–384. Edited by S. Razin & J. G. Tully. New York: Academic Press.
68. **Glisson, J.R. (1993).** Micoplasmosis aviar. *Poultry Disease* **4**, 84-95.
69. **Goebel U. B., Geiser, A., & Stanbridge, E. J. (1987).** Oligonucleotide probes complementary to variable regions of ribosomal RNA discriminate between *Mycoplasma* species. *Journal of Genetic Microbiology* **133**, 1969-1974.

70. **Gourlay, R.N. & Howard, C.J. (1982).** Respiratory mycoplasmosis. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*, **26** 289-332.
71. **Gourlay R.N., Leach R.H. & Howard C.J. (1974).** *Mycoplasma verecundum*, a new species isolated from bovine eyes. *Journal of Genetic Microbiology* **81**, 475-484.
72. **Goldberg, D.R., Samuel, M.D., Thomas, C.B., Sharp, P., Krapu, G.L., Robb, J.R., Kenov, K.P., Korschege, C.E., Chipley, W.H., Conroy, M.J. & Kleven, S.H. (1995).** The occurrence of mycoplasmas in selected wild North American waterfowl. *Journal of Wildlife Diseases* **31**, 378-385.
73. **Hammond, P.P., Bradbury, J.M., Ramírez, A.S. & Morrow, C.J. (2004).** Combined detection and identification of *Mycoplasma synoviae* strains by amplification of a conserved part of the vlhA gene. Abstract of the 15 th Congress of the International Organization for Mycoplasma, Athens, GA, USA, pp. 88-83.
74. **Hanson, R.P. (1969).** Koch is dead. *Bulletin of the Wildlife Diseases Association* **5**, 150-156.
75. **Harasawa, R. (1999).** Genetic relationships among mycoplasmas based on the 16S-23S rRNA spacer sequence. *Microbiology Immunology* **43**, 127-132.

76. **Harasawa, R., Hotzel, H. & Sachse, K. (2000).** Comparasion of the 16S-23S rRNA intergenic spacer regions among strains of the *Mycoplasma mycoides* cluster, and reassessment sp. Bovine group 7. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**, 1325-1329.

77. **Harasawa, R., Mizusawa, H., Nozawa, K., Nakagawa, T., Asada, K. & Kato, K. (1993).** Detection and tentative identification of dominant mycoplasma species in cell cultures by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer regions. *Research Microbiology* **144**, 289-293.

78. **Harasawa, R., Pitcher, D.G., Ramírez, A.S. & Bradbury, J.M. (2004).** A putative transposase gene assigned in the 16S–23S rRNA intergenic spacer region of *Mycoplasma imitans*, *Microbiology* **150**, 1023-1029.

79. **Hartup, B.K., Mohammed, H.O., Kollias, G.V. & Dhondt, A.A. (1998).** Risk factors associated with mycoplasmal conjunctivitis in house finches. *Journal of Wildlife Diseases* **34**, 281-288.

80. **Hartup, B.K., Dhondt, A.A., Sydenstricker, K.V., Hochachka, W.M. & Kollias, G.V. (2001).** Host range and dynamics of mycoplasmal conjunctivitis among birds in North America. *Journal of Wildlife Diseases* **37**, 72–81.

81. **Höfle, U. & Blanco, J.M. (2001).** Prevalence of selected Pathogens in Captive and Free-Living Spanish Imperial Eagles (*Aquila Adalberti*) in Central Spain. 4th Eurasian Congress on Raptors, Raptor Research Foundation, 25-29 de septiembre, Sevilla, España.
82. **Höfle, U., Blanco, J.M. & Kaleta, E.F. (2001a).** Sero-prevalence of Viral Infections in Captive and Free-Living Birds of Prey in Spain - Implications for Conservation and Management of Wild and Captive Populations. International Joint Conference Society for Tropical veterinary Medicine and Wildlife Disease Association. Abstract book, Pilanesberg National Park, Sudafrica.
83. **Höfle, U., Blanco, J.M., Sperser, J., Johne, R. & Kaleta, E.F. (2002).** Mycoplasma and avian polyoma virus infection in captive Spanish Imperial Eagles (*Aquila adalberti*). *European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians (EAZW) 4th scientific meeting, joint with the annual meeting of the European Wildlife Disease Association (EWDA)*, Heidelberg, Germany.
84. **Höfle, U., Blanco, J.M., Vicente, A. & Rodriguez, A. (2001b).** Atypic aspergillosis- A new treat to the Iberian Imperial Eagle (*Aquila adalberti*). Proceedings, 6th. European AAV-DVG Congress, Marzo, Munich, Alemania.
85. **Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. & Williams, S.T. (1994).** Bergeys Manual of Determinative Bacteriology. 9 th ed. Baltimore: Williams and Wilkins.

86. **Hoffman, R.W., Luttrell, M.P., Davidson, W.R. & Ley, D.H. (1997).** Mycoplasmas in wild turkeys living in association with domestic fowl. *Journal of Wildlife Diseases* **33**, 526 - 535.
87. **Howard, C.J. and Gourlay, R.N. (1978).** Mycoplasmas of animals. *Science Progress* **65**, 313-329.
88. **Ibrahim, R.S., Sohair, A. & Hussein, Z. (2000).** Bacterial agents associated with sinusitis in waterfowls and turkeys in Assiut and El-Minia Governorates. *Assist Veterinary Medicine Journal* **44**, 185-195.
89. **Ikoiev, V.N., Pille, E.R. & Dzagurov, S.G. (1972).** Survey of Japan ese quails for mycoplasmosis. *Vopr. Virusol* **17**,104-107.
90. **Ivanics, E., Glavits, R., Takacs, G., Molnar, E., Bitay, Z., & Meder, M. (1988).** An outbreak of *Mycoplasma anatis* infection associated with nervous symotoms in large-scales duck flocks. *Journal of Veterinary Medicine* **35**, 368-378.
91. **Jensen, J.S., Borre, M.B. & Dohn, B. (2003).** Detection of *Mycoplasma genitalium* by PCR amplification of the 16S rRNA gene. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 261-266.
92. **Johansson, K.E., Healdtander, M.U.K., & Pettersson, B. (1998).** Characterization of mycoplasmas by PCR and sequence analysis with universal 16S rDNA primers. *Methods in Molecular Biology*, vol. 104: Mycoplasma protocols. R, Miles and R. Nicholas Eds. Pp. 145-165.
93. **Jordan, F.T.W. (1985).** Recovery and identification of avian mycoplasmas. In *Methods in mycoplasmology*, vol 1, pp.69-79. Edited by Tully, J.G. and Razin, S. New York. Academic Press.

94. **Jordan, F.T.W. (1990).** *Mycoplasma meleagridis* infection. In F.T.W. Jordan, Editor, Avian Mycoplasmoses, Poultry Diseases (3rd ed.), pp. 81-83. Great Britain. Cambridge University Press.
95. **Jordan, F.T.W., Erno, H., Cottew, G.S., Hinz, K.H. & L. Stipkovits. (1982).** Characterization and taxonomic description of five *Mycoplasma* serovars (serotypes) of Avian origin and their elevation to species of *Mycoplasma synoviae*. *International Journal Systematic Bacteriology* **32**, 108-115.
96. **Jordan, F.T.W., Howse, J.N., Adams, M.P. & Fatunmbi, O.O. (1981).** The isolation of *Mycoplasma columbinum* and *Mycoplasma columborale* from feral pigeons. *Veterinary Record* **109**, 450.
97. **Keeler, C.L., Hnatow, L.L., Whetzel, P.L. & Dohms, J.E. (1996).** Cloning and characterization of a putative cytoadhesin gene (*mgc1*) from *Mycoplasma gallisepticum*. *Infection and Immunity* **64**, 1541-1547.
98. **Kempf, I., Guittet, M. & Bennejean, G. (1997).** Identification of two pathogenic mycoplasma as strains of *Mycoplasma pullorum*. Lab. Biologique cellulaire et moléculaire. INRA. Edouard-Bonleaux. Francia
99. **Kerstens, K., Pot, B., Dewettinck, D., Torck, U., Vancanneyt, M., Vauterin, L., and Vandamme, P. (1994).** Identification and typing of bacteria by protein electrophoresis. In *Bacterial diversity and systematics*, pp. 51-66. Priest, F. G., Ramos-Cormenzana, A., and Tyndall, B. (eds.). New York: Plenum Press

100. **Kirchhoff, H. & Rosengarten, R. (1984).** Isolation of a motile mycoplasma from fish. *Journal General Microbiology* **130**, 2439-2445.
101. **Kleven, S.H. (1990).** Summary of discussions of avian mycoplasma team. *Avian Pathology* **19**, 795-800.
102. **Kleven, S.H. (2001).** Some perspectives on micoplasma diagnosis and control. XVII Congreso Latinoamericano de Avicultura. 2001.
103. **Kleven, S.H. (2003).** *Mycoplasma synoviae* infection. In Y.M. Diseases of Poultry, 11 th edn pp.756-766. Edited by Saif, H.J. Barnes, J.R. Glisson, A.M. Fadly, L.R. McDougald & D.E. Swayne. Iowa State Press.
104. **Kleven, S.H. (2008).** Control of Avian Mycoplasma Infections in Commercial Poultry. *Avian Diseases* **52**, 367-374.
105. **Kleven, S.H. & Levinshon, K. (1996).** Mycoplasmas infection of poultry. In Molecular and diagnostic procedure in Mycoplasmology. Pp. 283-292.
106. **Kleven, S.H., King, D.D. & Anderson, D.P. (1972).** Airsacculitis in broilers from *mycoplasma synoviae*: effect on air-sac lesions of vaccinating with infectious bronchitis and newcastle virus. *Avian Diseases* **16**, 915-924.

107. **Kübber-Heiss, A., Gerritsmann, H., Cronstedt-Fell, A., Richter, B. & Spergser, J. (2010).** Detection of “*Mycoplasma aquilae*” in an Eurasian buzzard (*Buteo buteo*) in Austria. 9th Biennial Conference of the European Wildlife Disease Association Vlieland, The Netherlands, 13 to 16 September 2010.
108. **Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
109. **Lane, D. L., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., and Pace, N. R. (1985).** Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. *Proceedings Academic Science USA* **82**, 6955-6959.
110. **Leach, R. H. (1983).** Preservation of mycoplasma cultures and culture collections. In *Methods in Mycoplasmaology*, vol. 1, pp. 197–204. Edited by S. Razin & J. G. Tully. New York. Academic Press.
111. **Lecis, R., Chessa, B., Cacciotto, C., Addis, M. F., Coradduzza, E., Berlinguer, F., Muzzeddu, M., Lierz, M., Carcangiu, L., Pittau, M. & Alberti, A. (2010a).** Identification and characterization of novel *Mycoplasma* spp. belonging to the *hominis* group from griffon vultures. *Research in Veterinary Science* **89**, 58-64.
112. **Lecis, R., Chessa, B., Cacciotto, C., Addis, M.F., Coradduzza, E., Muzzeddu, M., Pittau, M. & Alberti, A. (2010b).** Identification and characterization of *Mycoplasma* spp. and *Salmonella*

spp. in griffon vultures and wild tortoises housed in a Wildlife recovery centre in Sardinia (Italy).

113. **Lefevre, P.C., Bréard, A., Al Farouk, & Buron, S. (1987).** Mycoplasma species F38 isolated in Chad. *Veterinary Record* **121**, 575-576.

114. **Lemus, J.A., Blanco, G., Grande, J., Arroyo, B., García-Montijano, M., et al (2008).** Antibiotics Threaten Wildlife: Circulating Quinolone Residues and Disease in Avian Scavengers. *PLoS ONE* **3**(1): e1444. doi:10.1371/journal.pone.0001444.

115. **Lerman, L. S. & Beldjord, C. (1999).** Comprehensive mutation detection with denaturing gradient gel electrophoresis. In *Mutation Detection*, pp. 35–61. Edited by R. G. H. Cotton, E. Edkins and S. Forrest. New York. Oxford University Press.

116. **Ley, D.H. (2008).** *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: Y.M. Diseases of Poultry (12th ed.) pp. 805-834. Edited by Saif, A.M. Fadly, J.R. Glisson, L.R. McDougald, L.K. Nolan and D.E. Swayne. Ames. Blackwell Publishing.

117. **Ley, D.H., Berkhoff, J.E., & Levisohn, S. (1997).** Molecular epidemiologic investigations of *Mycoplasma gallisepticum* conjunctivitis in songbirds by random amplified polymorphic DNA analyses. *Emerging Infectious Diseases* **3**, 375–380.

118. **Ley, D.H., Berkhoff, J.E. & McLaren, J.M. (1996).** *Mycoplasma gallisepticum* isolated from House finches (*Carpodacus mexicanus*) with Conjunctivitis. *Avian diseases* **40**, 480-483.

119. **Ley, D.H., Geary, S.J., Berkhoff, J.E., McLaren, J.M., & Levisohn, S. (1998).** *Mycoplasma sturni* from Blue Jays and Northern Mockingbirds with Conjunctivitis in Florida. *Journal of Wildlife Diseases* **34**, 403-406.
120. **Lierz, M. & Hafez, H.M. (2009).** Mycoplasma species in psittacine birds with respiratory disease. *Veterinary record* **164**, 629-630.
121. **Lierz, M., Deppenmeier, S., Gruber, A.D., Brokat, S., Hafez, H.M. (2007a).** Pathogenicity of *Mycoplasma lipofaciens* strain ML64 for turkey embryos. *Avian Pathology* **36**, 389-393.
122. **Lierz, M., Hagen, N., Lueschow, D. & Hafez, H.M. (2008a).** Use of polymerase chain reactions to detect *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma imitans*, *Mycoplasma iowae*, *Mycoplasma meleagridis* and *Mycoplasma synoviae* in birds of prey. *Avian Pathology* **37**, 471-476.
123. **Lierz, M., Jansen, A., & Hafez, M. (2008b).** Avian *Mycoplasma lipofaciens* transmission to Veterinarian. *Emerging Infectious Diseases* **14**, 1161-1162.
124. **Lierz, M., Jansen, A., & Hafez, M. (2008c).** Occurrence of mycoplasmas in semen samples of birds of prey. *Avian Pathology* **37**, 495-497.
125. **Lierz, M., Obon, E., Schink, B., Carbonell, F. & Hafez, H.M. (2008d).** The role of mycoplasmas in a conservation project of the lesser kestrel (*Falco naumanni*). *Avian diseases* **52**, 641-645.
126. **Lierz, M., Schmidt, R., Goebel, T., Ehrlein, J. & Runge, M. (2000a).** Detection of *Mycoplasma spp.* in raptorial birds in Germany. In

Raptor Biomedicine III (pp. 25-33). Edited by J.T. Lumeij, J.D. Remple, P.T. Redig, M. Lierz & J.E. Cooper. Lake Worth: Zoological Education Network.

127. **Lierz, M., Schmidt, R. & Runge, M. (2002).** Mycoplasma species isolated from falcons in the Middle East. *Veterinary Records* **151**, 25-33

128. **Lierz, M., Stark, R., Brokat, S. & Hafez, H.M. (2007b).** Pathogenicity of *M. lipofaciens* strain ML64, isolated from an egg of a Northern Goshawk (*Accipiter gentilis*), for chicken embryos. *Avian Pathology* **36**, 151-153.

129. **Lin, M., Liu, S., Su, W., Lan, Y., Chung, I., Lin, M.Y., Liu, S.S., Su, W.S., Lan, Y.C. & Chung, I.C. (1995).** Isolation of avian mycoplasmas from geese in Taiwan. *Journal of the Chinese Society of Veterinary Medicine* **21**, 347-353.

130. **Lobo, L., Chavez, Y., Agüero, J.A., & Martínez, S. (2002).** Aislamiento e identificación de *Mycoplasma pullorum* como cepa de nuevo reporte en Cuba. *Revista Cubana de Ciencia Avícola* **26**, 103-109.

131. **Loria, G.R., Ferrantelli, E., Girdina, G., Vecchi, L.L., Sparacino, L., Oliveri, F., Mc Auliffe L. & Nicholas, R.A.J. (2008).** Isolation and Characterization of Unusual Mycoplasma spp. From Captive Eurasian Griffon (*Gyps fulvus*) in Sicily. *Journal of Wildlife Diseases* **44**, 159-163.

132. **Loria, G.R., Tamburello, A., Liga, F., Lawes, J. & Nicholas, R.A.J. (2005).** Isolation of mycoplasma from pigeons suffering eye lesions and respiratory disease. *Veterinary Records* **157**, 664-665.

133. Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Förster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A. W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A, Liss, T., Lüßmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A. & Schleifer, K.H. (2004). ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research* **32**, 1363-1371.
134. Luttrell, M.P., & Fischer, J.R. (2007) Mycoplasmosis. In *Infectious Diseases of Wild Birds*, pp. 317-331. Edited by Thomas, N.J., Hunter, D.B. & Atkinson, CT. Iowa, USA, NJ. Blackwell Publishing Professional.
135. Luttrell, M.P., Eleazer, T.H., & Kleven, S.H. (1992). *Mycoplasma gallopavonis* in Easter wild turkeys. *Journal of Wildlife Diseases* **28**, 288-291.
136. Luttrell, M.P., Fischer, J.R., Stallknecht, D.E. & Kleven, S.H. (1996). Field investigation of *Mycoplasma gallisepticum* infections in house Finches (*Carpodacus mexicanus*) from Maryland and Georgia. *Avian diseases* **40**, 335-341.
137. MacOwan, K., Jones, H.G., Randall, C.J. & Jordan, F.T. (1981). *Mycoplasma columborale* in a respiratory condition of pigeons and experimental sacculitis of chickens. *Veterinary Record* **109**, 562.
138. Madden, D.L., Henderson, W.H. & Moses, H.E. (1967). Isolation of *Mycoplasma gallisepticum* from Bob white quail (*Colinus virginianus*). *Avian Disease* **11**, 378-380.

139. **Markham, F.S. & Wong, S.C. (1952).** PPLO organism in the etiology of turkey sinusitis and C.R.D. of chickens. *Poultry of Science* **31**, 902-904.
140. **Marmur, J. (1961).** A Procedure for the Isolation of Deoxyribonucleic Acid from Microorganisms. *Journal of Molecular Biology* **3**, 208-218
141. **Marois, C., Dufour Gesbert, F. & Kempf, I. (2002a).** Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum* in environmental samples. *Avian Pathology* **31**, 163-168.
142. **Marois, C., Savoye, C., Kobisch, M. & Kempf, I. (2002b).** A reverse transcription-PCR assay to detect viable *Mycoplasma synoviae* in poultry environmental samples. *Veterinary Microbiology* **89**, 17-28.
143. **McAuliffe, L., Ellis, R.J., Ayling, R.D. & Nicholas, R.A.J. (2003).** Differentiation of Mycoplasma Species by 16S Ribosomal DNA PCR and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 4844-4847.
144. **McAuliffe, L., Ellis, R., Lawes, J., Ayling, R.D. & Nicholas, R.A.J. (2005).** 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis; a single generic test for detecting and differentiating Mycoplasma species. *Journal of Medical Microbiology* **54**, 731-739.
145. **MacOwan, K.J., Jones, H.G.R., Randall, C.J. and Jordan, F.T.W. (1981).** *Mycoplasma columborale* in a respiratory condition of pigeons and experimental air sacculitis of chickens. *Veterinary Record* **109**, 562.

146. **Martin de las Mulas, J., Fernández, A., Sierra, M.A., Poveda, J.B. & Carranza, J. (1990).** Immunohistochemical demonstration of *Mycoplasma gallinarum* and *Mycoplasma gallinaceum* in naturally infected hen oviducts. *Research in Veterinary Science* **49**, 339-345.
147. **Mikaelian, I., Ley, D.H., Claveau, R., Lemieux, M. & Berube, J.P. (2001).** Mycoplasmosis in evening and pine grosbeaks with conjunctivitis in Quebec. *Journal of Wildlife Diseases* **37**, 826-830.
148. **Miles, R.J., & Agbanyim, C. (1998).** Determination of substrate utilization rates by mycoplasmas. In: *Mycoplasma Protocols: Methods in Molecular Biology*, pp, 95-103. Edited by Miles, R.J. and Nicholas, R.A.J. Totowa, New Jersey: Humana Press.
149. **Morishita, T.Y., Aye, P.P. & Brooks, D.C. (1997).** A survey of diseases of raptorial birds. *Journal of Avian Medicine and Surgery* **11**, 77-92.
150. **Muyzer, G., de Waal, E.C. & Uitterlinden, A.G. (1993).** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16 S rRNA. *Application Environ Microbiology* **59**, 695-700.
151. **Nagatomo, H., Kato, H., Shimizu, T. & Katayama, B. (1997).** Isolation of Mycoplasma from fantail pigeons. *Journal Veterinary Medicine Science* **59**, 461-462.

152. **Neimark, H., Johansson, K.E., Rikihisa, Y. & Tully, J.G. (2001).** Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of 'Candidatus *Mycoplasma haemofelis*', 'Candidatus *Mycoplasma haemomuris*', 'Candidatus *Mycoplasma haemosuis*' and 'Candidatus *Mycoplasma wenyonii*'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**, 891-899.
153. **Nelson, J.B. (1936).** Coccobacilliform bodies in birds infected with the coryza of slow onset. *Journal of Experimental of Medicine* **62**, 515-552.
154. **Nicolet, J. (1996).** Animal Mycoplasmoses: a general introduction. *Review Sel. Tech. Off. Int. Epiz.* **15**, 1233-1240.
155. **Oaks, J.L., Donahoe, S.L., Rurangirwa, F.R., Rideout, B.A., Gilbert, M., & Virani, M.Z. (2004).** Identification of a Novel Mycoplasma Species from an Oriental White-Backed Vulture (*Gyps bengalensis*). *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 5909-5912.
156. **Olsen, G.J., Woese, C.R. (1993).** Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *Federation of American Societies for Experimental Biology* **7**, 113-123.
157. **Olson, N.O., Kerr, K.M. & Campbell, A. (1964).** Control of infectious synovitis. The antigen study of three strains. *Avian Diseases* **8**, 209.

158. **Osama, M., Ross, G. & Bradbury, J.M. (1996).** Pathogenicity and Cytadherence of *Mycoplasma imitans* in Chicken and Duck Embryo Tracheal Organ Cultures. *Infection and Immunity* **64**, 563-568.
159. **Palacios, C.J. (2004).** Current status and distribution of birds of prey in the Canary Islands. *Bird Conservation International* **14**, 203-213.
160. **Palacios, C.J., Gangoso, L., Donázar, J.A., Hiraldo, F., Negro, J.J., Ceballos, O. & de la Riva, M. (2002).** El alimoche Canario. Una nueva subespecie en peligro de extinción: *Neophron percnopterus majorensis*;
<http://www.um.es/gtiweb/adrico/medioambiente/alimoche%20canario.htm>
161. **Panangala, V.S., Stringfellow, J.S., Dybvig, K., Woodard, A., Sun, F., Rose, D.L., & Gresham, M. (1993).** *Mycoplasma corogypsi* sp. Nov., a New Species from the Footpad Abscess of a Black Vulture (*Coragypis atratus*). *International Journal of Systematic Bacteriology* **43**, 585-590.
162. **Pagés-Manté, A. (2005).** Problemas patológicos en las granjas de recría y ponedoras comerciales. Jornadas Profesionales de Avicultura de Carne.
163. **Papazisi, L., Gorton, T. S., Kutish, G. & 7 other authors (2003).** The complete genome sequence of the avian pathogen *Mycoplasma gallisepticum* strain R_{low}. *Microbiology* **149**, 2307–2316.

164. **Pennycott, T.W., Dare, C.M., Yavari, C.A. & Bradbury, J.M. (2005).** *Mycoplasma sturni* and *Mycoplasma gallisepticum* in wild birds in Scotland. *Veterinary Record* **156**, 513-515.
165. **Pérez-Luz, S., Rodríguez-Valera, F., Lan, R., Shah, S.M. & Van Santen, V.L. (1998).** Variaton of the ribosomal operon 16S-23S gene spacer region in representatives of *Salmonella entérica subspecies*. *Journal of Bacteriology* **180**, 2144-2151.
166. **Peters, I.R., Helps, C.R., McAuliffe, L., Neimark H., Lappin, M.R., Gruffydd-Jones, T.J., Day, M.J., Hoetzle, L.E., Willi, B., Meli, M., Hofmann-Lehmann, R. & Tasker, S. (2008).** RNaseP RNA Gene (*rnpB*) Phylogeny of Haemoplasmas and Other Mycoplasma Species. *Journal of Clinic Microbiology* **46**, 1873-1877.
167. **Pettersson, B., Leitner, T., Ronaghi, M., Bolske, G., Uhlen, M. & Johansson, K. E. (1996a).** Phylogeny of the Mycoplasma mycoides cluster as determined by sequence analysis of the 16S rRNA genes from the two rRNA operons. *Journal of Bacteriology* **178**, 4131- 4142.
168. **Pettersson, B., Tully, J.G., Bölske G. & Johansson, K.E. (2000).** Updated phylogenetic description of the *Mycoplasma hominis* cluster (Weisburg *et al.* 1989) based on 16S rDNA sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**, 291-301.

169. **Pettersson, B., Uhlen, M., & Johansson, K.E. (1996b).** Phylogeny of Some *Mycoplasmas* from Ruminants Based on 16s rRNA Sequences and Definition of a New Cluster within the *Hominis Group*. *International Journal of Systematic bacteriology* **46**, 1093-1098.
170. **Poveda, J.B. (1998a).** Biochemical characteristics in mycoplasma identification. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 104: Mycoplasma Protocols; Miles and Nicholas (Eds.) Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 69-78.
171. **Poveda, J.B. & Nicholas, R.J.A. (1998).** Serological identification of mycoplasmas by growth and metabolism inhibition tests. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 104: Mycoplasma Protocols; Miles and Nicholas (Eds.) Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp.105–111.
172. **Poveda, J.B., Carranza, J., Miranda, A., Garrido, A., Hermoso, M., Fernandez, A. & Domenech, J. (1990a).** An epizootiological study of avian mycoplasma in southern Spain. *Avian Pathology* **19**, 627-633.
173. **Poveda, J.B., Giebel, J., Flossdorf, J., Meier, J. & Kirchhoff, H. (1994).** *Mycoplasma buteonis* sp. nov., *Mycoplasma falconis* sp. nov., and *Mycoplasma gypis* sp. nov., Three Species from Birds of Prey. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**, 94-98.
174. **Poveda, J.B., Giebel, J., Kirchhoff, H. & Fernandez, A. (1990b).** Isolation of mycoplasma from a buzzard, falcons and vultures. *Avian Pathology* **19**, 779-783.

175. **Poveda, J.B., Ramírez, A.S., De la Fe, C , Assuncáo, P., Díaz-Bertrana, L. (2002).** Micoplasmas. In Manual de Microbiología. Vadillo, S.M., Píriz, S.D., Mateos, E.M.Y. (eds.). McGraw-Hill. Interamericana. Madrid, pp. 423-430.

176. **Ramírez, A.S., González, M., Déniz, S., Fernández, A., & Poveda, J.B. (1997).** Evaluation of a modified SP-4 medium in the replication of *Mycoplasma* spp. In *Mycoplasmas of Ruminants: Pathogenicity, Diagnostics, Epidemiology and Molecular Genetics*, vol. 2, pp. 36-39, Edited by Frey J and Sarris K. European Cooperation on Scientific and Technical Research, Luxembourg.

177. **Ramírez, A.S., Naylor, C.J., Hammond, P.P & Bradbury, J.M. (2006).** Development and evaluation of a diagnostic PCR for *Mycoplasma synoviae* using primers located in the intergenic spacer region and the 23S rRNA gene. *Veterinary Microbiology* **118**, 76-82.

178. **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**, 279-287.

179. **Razin, S. (1995).** Molecular properties of mollicutes: a synopsis. In *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma*, vol. I, pp. 1-25, Molecular Characterization. Edited by Razin and Tully. Academic Press, Inc.

180. **Razin, S. (1997).** The minimal cellular genome of mycoplasma. *Indian Journal Biochemistry and Biophysics* **34**, 124-130.

181. **Read, A.F. & Taylor, L.H. (2001).** The ecology of genetically diverse infectious. *Science* **292**, 1099-1102
182. **Reece, R.L., Ireland, L. & Scott, P.C. (1986).** Mycoplasmosis in racing pigeon. *Australian Veterinary Journal* **63**, 166-167.
183. **Rahman, A.S., Al-Ankari & Bradbury, J.M. (1996).** *Mycoplasma iowae*: a review. *Avian Pathology* **25**, 205-22.
184. **Roberts, D.H. (1964).** The isolation of Influenza A virus and a Mycoplasma associated with duck sinusitis. *Veterinary Records* **76**, 470-473.
185. **Rocke, T.E., & Yuill, T.M. (1987).** Microbial infections in a declining wild turkey population in Texas. *The Journal of Wildlife Management* **51**, 778-782.
186. **Rodicio, M.R. & Mendoza, M.C. (2004).** Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: Principles, methods and applications in clinical microbiology. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. **22**, 238-245.
187. **Rosenbusch, R.F. (1994).** Biology and Taxonomy of the Mycoplasmas. *In* Mycoplasmosis in Animals: Laboratory Diagnosis Whitford, pp 3-11. Edited by Rosenbusch and Lauerman. Iowa State, University Press.
188. **Rosendal, S. (1988).** Mycoplasma. *Pathogenesis of Bact. Infections In Animals* **10**, 205-215.

189. **Ruder, M.G., Feldman, S.H., Wunschmann, A. & McRuer, D.L. (2009).** Association of *Mycoplasma corogypsi* and Polyarthritis in a Black Vulture (*Coragyps atratus*) in Virginia. *Journal of Wildlife Diseases* **45**, 808-816.
190. **Samuel, M.D., Goldberg, D.R., Thomas, C.B. & Sharp, P. (1995).** Effects of *Mycoplasma anatis* and cold stress on hatching success and growth of mallard ducklings. *Journal of Wildlife Diseases* **31**, 172-178.
191. **Senterfit, L. (1983).** Preparation of antigens and antisera. *Methods in Mycoplasmaology* **1**, 401-404.
192. **Shmuel R. & Hayflick, L. (2010).** Highlights of mycoplasma research-An historical perspective. *Biological* **38**, 183-190.
193. **Schmidt, V., Spergser, J., Cramer, K., Di Somma, A., Krautwald-Junghanns, M.A. & Bailey, T. (2009).** Mycoplasmas isolated from Stone curlews (*Burhinus oedicnemus*) used in falconry in the United Arab Emirates. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **40**, 316-320.
194. **Shimizu, T., Erno, H. & Nagatomo, H. (1978).** Isolation and characterization of *Mycoplasma columbinum* and *Mycoplasma columborale*. Two new species from pigeons. *International Journal Systematic Bacteriology* **28**, 583-546.
195. **Shimizu, T., Numano, K. & Uchida, K. (1979).** Isolation and identification of Mycoplasmas from various birds: an ecological study. *Japan Journal of Veterinary Sciences* **41**, 272-282.

196. **Simecka, E. R., Davis, J.K., Davidson, M.K., Ross, S.E., Stadtlaender, C.T.K.H. & Cassell, G.H. (1992).** Mycoplasma diseases of animals. In *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis*, pp. 391-415 Edited by Maniloff, J., R. H. McElhaney, L. R. Finch, and J. B. Basemann. Washington DC. American Society for Microbiology.
197. **Smart, C.D., Schneider, B., Blomquist, C.L., Guerra, L.J., Harrison, N.A., Ahrens, U., Lorenz, K.H., Seemüller, E. & Kirkpatrick, B.C. (1996).** Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1988-2993.
198. **Stackebrandt, E., & Goebel, B.M. (1994).** Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**, 846-849.
199. **Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A., Kampfer, P. & Maiden, M.C. (2002).** Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**, 1043-1047.
200. **Stamatakis, A. (2006).** RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of data and mixed models. *Bioinformatics* **22**, 2688-2690.
201. **Stipkovits, L., & Kempf, I. (1996).** Mycoplasmoses in poultry. *Rev. Science Tech. Off. Int. Epiz* **15**, 1495-1525.

202. **Stipkovits, L., El-Ebeedy, A.A., Kisary, J. & Varga, L. (1975).** Mycoplasma infection of geese. Incidence of Mycoplasma and Acholeplasmas in geese. *Avian Pathology* **4**, 35-43.
203. **Stipkovits, L., Bove, J.M., Rousselot, M., Larrue, P., Labat, M., & Vuillaume, A. (1984a).** Studies on mycoplasma infection of laying geese. *Avian Pathology* **14**, 57-68.
204. **Stipkovits, L., Laber, G. & Burch, D.G.S. (1993).** Comparative studies on efficacy of MG bacterin and tiamulin treatment of breeder layers. Proceedings X the World Veterinary Poultry Association Congress, Sydney, p155, Abstract 40.
205. **Stipkovits, L., Varga, Z.S., Dobos-Kovacs, M. & Santha, M. (1984b).** Biochemical and serological examination of some mycoplasma strains of goose origin. *Acta Veterinaria Hungarica* **32**, 116-125.
206. **Stipkovits, L., Varga, Z.S., Czifra, G.Y. & Dobos-Kovacs (1986).** Occurrence of mycoplasmas in geese affected with inflammation of the cloaca and phallus. *Avian Pathology* **15**, 289-299.
207. **Stipkovits, L., Varga, Z.S., Glavits, R., Ratz, F. & Molnar, E. (1987).** Pathological and immunological studies on goose embryos and one-day-old goslings experimentally infected with a mycoplasma strain of goose origin. *Avian Pathology* **16**, 453-468.
208. **Stipkovits, L., Varga, Zs. & Meszaros, J. (1985).** Mycoplasma infection of geese associated with disorders of reproductive tract. Proceedings of the 8th World Veterinary Medicine Association Congress, Jerusalem, p. 17 (abstract).

209. **Takahashi-Omoe, H., Omoe, K., Matsushita, S., Kobayashi, H. & Yamamoto, K. (2004).** Polymerase chain reaction with a primer pair in the 16S-23S rRNA spacer region for detection of *Mycoplasma pulmonis* in clinical isolates. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **27**, 117-128.
210. **Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007).** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 1596-1599.
211. **Tiong, S. K. (1978).** Isolation of *Mycoplasma gallisepticum* from sinuses of three quails (*Coturnix coturnix japonica*). *Veterinary Record* **103**, 539.
212. **Trampel, D.W. & Goll, F. (1994).** Outbreak of *Mycoplasma iowae* infection in commercial turkey poults. *Avian Diseases* **38**, 905-909.
213. **Tully, J.G. (1983).** Cloning and filtration techniques for mycoplasmas. In *Methods in Mycoplasmaology*, vol. 1, pp. 173-177. Edited by S. Razin & J. G. Tully. New York. Academic Press.
214. **Tully, J.G. (1985).** Newly discovered Mollicutes. In: *The Mycoplasmas*, vol IV, pp 1-26. *Mycoplasmas Pathogenicity*. Edited by Razin and Barile, Academic Press, Inc., Orlando.
215. **Tully, J.G. & Whitcomb, R.F. (1995).** Minimal standards for description of new species of the class *Mollicutes*. In: *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*, vol. I: *Molecular Characterization*, Razin and Tully (eds.), pp. 339-347.

216. **Urdiain, M., López-López, A., Gonzalo, C., Busse, H.J., Langer, S., Kämpfer, P. & Rosselló-Móra, R. (2008).** Reclassification of *Rhodobium marinum* and *Rhodobium pfennigii* as *Afifella marina* gen. nov.comb.nov.and *Afifella pfennigii* comb. nov., a new genus of photo heterotrophic *Alphaproteobacteria* and emended descriptions of *Rhodobium*, *Rhodobium orientis* and *Rhodobium gokarnense*. *Systematic and Applied Microbiology* **31**, 339-351.
217. **Van Herick, W., & Eaton, W.D. (1945).** An unidentified pleuropneumonia-like organisms isolated during passages in chick embryos. *Journal Bacteriology* **50**, 47-55
218. **Van Roekel, H., Olesiuk, O.M. & Pech, H.A. (1952).** Chronic respiratory disease of chickens. *American Journal of Veterinary Research* **13**, 252-259.
219. **Walker, R. V. L., & Bannister, G.L. (1953).** A filterable agent in ducks. *Canadian Journal of Comparative Medicine* **17**, 248-250.
220. **Wellehan, J.F.X., Calsamiglia, M., Ley, D.H., Zens M.S., Amonsin, A. & Kapur, V. (2001).** Mycoplasmosis in captive crows and robins from Minnesota. *Journal of Wildlife Diseases* **37**, 547-555.
221. **Weisburg, W.G., Tully J.G., Rose D.L., Petzel J.P., Oyaizu H., Yang D., Mandelco L., Sechrest J., Lawrence T.G., & Van Etten, J. (1989).** A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *Journal of Bacteriology* **171**, 455-467.
222. **Whaling, R.C. (2009).** The Detection of Mycoplasmas in Migratory Birds. PhD Thesis

223. **Whitford, H.W. (1994).** Biology and Taxonomy of the Mycoplasmas. *In: Mycoplasmosis in Animals: Laboratory Diagnosis*, Whitford, pp 12-14. Edited by Rosenbusch and Lauerman. Iowa State, University Press.
224. **Wobeser, G.A. (1997).** Mycoplasma infections. Diseases of wild Waterfowl. 2nd Ed. Plenum Press, New York, NY, U.S.A., pp. 87-88
225. **Wobeser, G.A. (2006).** Essential of Diseases in Wild Animals, 1^a. Ed., 2006. Blackwell Publishing Ltd. 9600 Garsington Road. Oxford OX4 2DQ, UK.
226. **Woese, C.R. (1987).** Bacterial evolution. *Microbiology Rev* **51**, 221-227.
227. **Woese, C.R., & Fox, G.E. (1977).** Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdom. *Proceeding Academic Science USA*. **74**, 5088-5090.
228. **Woese C.R., Maniloff J., Zablen L.B. (1980).** Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *Proceeding Academic Science* **77**, 494-498.
229. **Woese C.R., Stackebrandt E., Ludwig W. (1985).** What are mycoplasmas: the relationship of tempo and mode in bacterial evolution. *Journal of Molecular and Evolutionary* **21**, 305-316.
230. **Yamamoto, R., Ortmyer, H.B., Bigland, C.H., Seely, M.L. & Corstvet, R.E. (1965).** Isolation of "N" Mycoplasma from different sites of the turkey. *Poultry Science* **44**, 732-736.

231. **Yarza, P., Ludwig W., Euzéby J., Amann, R., Schleifer, K.H., Glöckner F.O. & Rosselló-Móra, R. (2010).** Update of the All-Species Living-Tree Project based on 16S and 23S rRNA sequence analyses. *Systematic and Applied Microbiology* **33**, 291-299.

232. **Yarza, P., Richter, M., Peplies, J., Euzéby, J., Amann, R., Schleifer, K.H., Ludwig, W., Glöckner, F.O. & Rosselló-Móra, R. (2008).** The All-Species Living Tree Project: a regularly updated 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. *Systematic and Applied Microbiology* **31**, 241-250.

233. **Yoder, H.W. Jr. (1990).** Avian Mycoplasmas. In Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycoplasmaology, 5^aEd., pp 237-243. Edited by Carter and Cole. Academic Press, New York.

234. **Yoon, J.H., Lee, S.T., Kim, S.B., Goodfellow & Park, Y.H. (1997).** Inter and intraspecific genetic analysis of the genus *Saccharomonospora* with 16S to 23S ribosomal DNA and 23S to 5S rDNA internally transcribed spacer sequences. *International Journal Systematic of Bacteriology* **47**, 661-669.

235. **Young, J.M., Kuykendall, L.D., Martínez-Romero, E., Kerr, A. & Sawada, H. (2001).** A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**, 89-103.

236. **Zain, Z.M. & Bradbury, J.M. (1995).** The influence of type of swap and laboratory method on the recovery of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* in broth medium. *Avian Pathology* **24**, 707-716.

Alejandro Suárez Pérez

AGRADECIMIENTOS

Alejandro Suárez Pérez

Esta Tesis Doctoral no hubiera sido posible sin la participación de diversas personas que me han brindado su apoyo y me han animado durante su redacción y elaboración. Aun a riesgo de olvidar a alguien, me gustaría citar de manera muy especial:

A mi director, José B. Poveda Guerrero, por brindarme la oportunidad de estudiar las enfermedades en las aves silvestres y ofrecerme los conocimientos, contactos y medios para la realización de este trabajo.

A mi codirectora, Ana Sofía Ramírez Corbera, por su apoyo incondicional y su inquebrantable optimismo, especialmente durante las largas horas de análisis de secuencias genómicas que ha generado este estudio.

De la misma manera, esta tesis no hubiera sido posible sin el apoyo del Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria (IUSA), especialmente representado por su director, Antonio Fernández Rodríguez al que agradezco sus buenos consejos y dedicación.

Mi agradecimiento también a todos los responsables de los centros de recuperación de fauna silvestre por su entrega y entusiasmo. Especialmente, quisiera darles las gracias a las “Helenas”, del Centro de Recuperación “El Chaparrillo”; a todos los trabajadores del CERI y por supuesto a Juan Manuel Blanco y Ursula Höffle por su sabiduría al mostrarme un camino que espero me acompañe siempre.

A Pascual Calabuig y Loly Estévez que, junto a todos los trabajadores del Centro de Recuperación de Fauna Silvestre del Cabildo de Gran Canaria “Tafira”, me han dedicado tantas horas de trabajo llenas de conocimiento, compromiso y buen hacer.

A Ramón Rosselló y Robin Nicholas, por brindarme su valiosa visión científica. A Susana Estupiñán, por corregir gramaticalmente esta tesis; sus comentarios y sugerencias constructivas me han sido de una ayuda inconmensurable para la redacción y corrección del texto.

A mi primo Sauce, por regalar su arte a la portada de esta tesis y a todos los miembros de AVAFES Canarias que me han acompañado en esta aventura de casi cinco años en la que hemos intentado cambiar el mundo.

He querido dejar para el final a los más importantes colaboradores de esta tesis doctoral que han sido mis compañeros de laboratorio: Carlos, Lidia, Fleitas y Orestes, que me han dado muy buenos momentos entre geles de agarosa y colonias típicas de huevo frito. Este agradecimiento se hace extensivo a todos los becarios, profesores y personal del IUSA y de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Especialmente, no quisiera dejar de expresar mi gratitud a mi amigo Rubén Santana que a pesar de encontrarse muy lejos de aquí, siempre ha tenido la preocupación de responder a mis inquietudes bacteriológicas con atención, paciencia y alegría. Gracias a su entusiasmo y conocimientos, la idea generada en el laboratorio de Epidemiología

y Medicina Preventiva se ha podido transformar en esta tesis doctoral. Muchas gracias.

A mis padres, Fernando y Macame, por su inmenso cariño, sin el cual no hubiera podido ser quien soy, y a los que espero poder devolver poco a poco, todo el amor que he recibido.

Por último, me gustaría recordar el importante papel que han desempeñado todas y cada unas de las aves silvestres de este estudio; espero que trabajos como éste aporten los conocimientos necesarios que mejoren la salud y el bienestar de estos animales.

Alejandro Suárez Pérez
