

LA MOSCA DOMÉSTICA (*Musca domestica*) NO ES VECTOR DE MICOPLASMAS

José Antonio Rivera-Tapia (jart70@yahoo.com)¹,
Cristian Dionisio Román-Méndez², Mayra Vega-Benítez³.
¹Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas,
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
²Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
Instituto Politécnico Nacional
³Escuela de Biología
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Artículo recibido: 19 de octubre 2001

Artículo aceptado: 22 de marzo 2002

RESUMEN

Se colectaron 700 moscas en la ciudad de Puebla. Se examinó la posible presencia de micoplasmas en la superficie externa y en tracto digestivo, por medio de cultivo directo para micoplasmas y la aplicación de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para detectar un fragmento de 301 pb específico para género *Mycoplasma*. El total de las muestras colectadas resultaron negativas para el aislamiento de micoplasmas en superficie externa y tracto digestivo de las moscas por medio de cultivo directo como se indicó anteriormente. Los resultados del PCR fueron negativos. Diferentes especies de micoplasmas se relacionan con diversas enfermedades en el humano, por tanto se sugiere considerar la importancia que tiene el conocer qué mecanismos están involucrados en la dispersión de dichos microorganismos.

Palabras clave: Micoplasmas, *Musca domestica*, vector.

ABSTRACT

700 flies were collected in Puebla city. The possible presence of mycoplasmas was examined in the external surface and in digestive tract, using direct cultivation for mycoplasmas and the application of the polymerase chain reaction technique (PCR), to detect a fragment of 301 bp specific for *Mycoplasma* genus. The total of the collected samples was negative for the mycoplasmas isolation in external surface and digestive tract of the flies in direct cultivation. The results of the PCR were negative. Different mycoplasmas species are related with diverse diseases in humans, therefore it is suggested considering the importance of knowing which mechanisms are involved in the dispersion of this microorganisms.

Key words: Mycoplasmas, *Musca domestica*, vector.

INTRODUCCIÓN

Los micoplasmas son los microorganismos más pequeños de vida libre autorreplicables con requerimientos nutricionales exigentes y que se caracterizan por presentar un genoma que va de las 500 hasta las 1400 pares de bases, además por carecer de una pared celular, presentan formas pleomórficas (Razin *et al.*, 1998).

Estos microorganismos causan diversas enfermedades en animales y en el humano, en este último en casos de artritis, lesiones de la piel, abscesos del tubo ovárico, entre otras (Tully, 1993).

Los micoplasmas tienen la capacidad de activar al sistema inmunológico, inducir la liberación de citocinas e invadir a eritrocitos, linfocitos y monocitos, como es el caso de *Mycoplasma penetrans* que se adhiere a superficies celulares pudiendo penetrar a ellas. Por tanto la extensiva invasión de este microorganismo al citoplasma puede provocar la muerte celular (Lo *et al.*, 1993a; Brenner *et al.*, 1996; Salman *et al.*, 1998). Además, se ha observado que algunos de los efectos que provocan los micoplasmas son mediados por el sistema nervioso central, ya que recientemente se reportó que *Mycoplasma fermentans* se establece en cerebro y diversos tejidos de pacientes con

Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).

De forma experimental inoculando a *Mycoplasma fermentans* vía intracerebroventricular en ratas, se observó elevación en la temperatura corporal, supresión de los niveles de actividad locomotora y exploratoria en pruebas a campo abierto e incremento en la producción de prostaglandina E2 (PGE2) en hipotálamo, hipocampo y tejido cortical. Con estos resultados los autores sugieren que la presencia de *Mycoplasma fermentans* en cerebro puede ser responsable de ciertos cambios conductuales en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Yirmiya *et al.*, 1997).

El estudio del potencial oncogénico de *Mycoplasma fermentans* se analizó en células de embrión de ratón (C3H), exhibiendo cambios fenotípicos con características malignas. Estos cambios son reversibles si el micoplasma es erradicado por medio de tratamiento con antibióticos, de lo contrario la transformación celular incluye la capacidad de formar tumores en los animales. La oncogénesis mediada por micoplasmas presenta la participación de ciertas características establecidas en el desarrollo del cáncer humano (Tsai *et al.*, 1995).

Sloot *et al.* (1996) observaron que individuos con SIDA o leucemia, positivos a micoplasmas, presentaban complicaciones como neumonía recurrente bacteriana y sarcoma de Kaposi pulmonar, concluyendo que los pacientes positivos al VIH pueden ser colonizados o infectados más fácilmente por micoplasmas que los pacientes negativos al VIH.

A partir de muestras de orina de niños positivos al VIH se identificaron micoplasmas en un 87% y en muestras de pacientes negativos al VIH en un 20%, por medio de la técnica de PCR. Observándose que *M. penetrans*, *M. pirum*, *M. fermentans* y *M. genitalium* se aislaron de pacientes que presentaban inmunodeficiencia severa, mientras que *M. hominis* y *Ureaplasma urealyticum* fueron aislados con más frecuencia en niños que presentaban las primeras etapas de la infección por VIH y en

pacientes negativos al virus (Hussain *et al.*, 1999).

Debido a la relación que presentan los micoplasmas con diversas enfermedades, incluso aquellas que llegan a términos fatales, se ha tratado de estudiar los mecanismos de dispersión en el ambiente, ya que se han observado diversos géneros bacterianos de interés médico como *Escherichia*, *Vibrio*, *Salmonella*, *Shigella*, *Helicobacter*, *Chlamydia* y *Pseudomonas* (Forsey y Darougar, 1981; Levine y Levine, 1991; Khalil *et al.*, 1994; Grubel *et al.*, 1997) en ambientes hospitalarios, urbanos, rurales y caseros (Echeverría *et al.*, 1983; Adeyemi y Dipielou, 1984; Khin *et al.*, 1989; Fotedar *et al.*, 1992).

El presente trabajo tiene como objetivo determinar si la mosca doméstica (*Musca domestica*) participa en la dispersión de micoplasmas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se colectaron 700 moscas (*Musca domestica*) en el exterior del Hospital Universitario de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), durante el periodo de enero-diciembre del 2000.

Se utilizaron las cepas de referencia *Mycoplasma fermentans* PG-18, *Mycoplasma fermentans* P-140, *Mycoplasma penetrans* GTU-54, *Mycoplasma pirum* y *Mycoplasma pneumoniae* que fueron proporcionadas por el laboratorio de micoplasmas del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la BUAP.

Medios de cultivo

Caldo para micoplasmas SP-4: 65 ml de agua destilada, 2 g de base para micoplasmas Becton Dickinson, 0.5 g de dextrosa, 1 g de triptona, 0.5 g de peptona, 1 ml de rojo de fenol al 0.4 %, 25 ml de suero de caballo *Hy Clone*, 10 ml de dializado de levadura, 0.2 g de ADN, 5 ml de CMRL 1066 (10x), 10 ml de yestolato al 2%, 1 ml de solución de glucosa al 50% y 0.12 g de penicilina G sódica.

Agar Eaton: 65 ml de agua destilada, 2 g de base para micoplasmas Becton Dickinson, 0.5 g de dextrosa, 1.3 g de agar bacteriológico, 25 ml de suero de caballo *Hy*

Clone, 10 ml de dializado de levadura y 0.12 g de penicilina G sódica.

Procesamiento de las muestras de la superficie externa de las moscas

Se resuspendieron 350 moscas en 1 ml de medio para micoplasmas SP-4 cada una por separado en tubos estériles, se agitaron durante 15 minutos e incubaron a 37° C durante 5 horas. Las muestras se filtraron a través de una membrana de 0.45µ transfiriéndose a otra serie de tubos incubándose a 37° C durante 24 horas. Posterior a las 24 horas se sembraron 5 µl de cada una de las muestras en agar Eaton y se incubaron a 37° C durante 24 horas, con la finalidad de confirmar su aislamiento por medio de microscopía.

Procesamiento de las muestras del tracto digestivo de las moscas

En 1 ml de solución de fenol al 5 % se resuspendieron 350 moscas por separado en tubos estériles, agitando durante 5 minutos con la finalidad de descontaminar la superficie externa. A continuación las moscas fueron enjuagadas con una solución salina al 0.9 % para eliminar el fenol. Las moscas se inmovilizaron a 4° C colocándose en una superficie de parafina y fijadas con alfileres entomológicos, realizando una disección ventral con la ayuda de una aguja y microscopio para disección, removiendo el tracto digestivo, siendo transferido y homogenizado en 1 ml de medio SP-4 e incubado a 37° C durante 5 horas. Las muestras se filtraron a través de una membrana de 0.45µ incubándose a 37° C por 24 horas. A partir de estas muestras se sembraron 5 µl de cada muestra en agar Eaton y se incubaron bajo las mismas condiciones.

Cultivo de las cepas de referencia

En caldo SP-4 se cultivaron las cepas durante 24 horas a 37° C en condiciones aerobias, sembrándose en agar Eaton e incubándose a 37° C durante 24 horas para confirmar su viabilidad por medio de microscopía.

Extracción del ADN bacteriano

Se centrifugó 1 ml de cada una de las muestras, tanto de las cepas de referencia

como de las muestras problema, a 14 000 revoluciones por minuto (rpm) durante 20 minutos. El botón resultante se resuspendió en 500 µl de buffer de lisis que contiene: 10 mM de Tris-HCl (pH 8.5), 10 mM de KCl, 2.5 mM de MgCl₂, 1% Tween-20, 1% Tritón X-100 y 5 mg/ml de proteinasa K. La suspensión celular fue incubada durante 1 hora a 60° C y posteriormente se guardó a 4° C, el extracto celular se utilizó para detectar el ADN por medio de la técnica de PCR.

Iniciadores

Los iniciadores AR1 y AR2, utilizados para la amplificación son descritos por Shidu *et al.* (1995), estos amplifican un fragmento de 301 pb, reconociendo una secuencia conservada del ARNr en treinta especies de micoplasmas. La secuencia del iniciador AR1 es 5´ ATG RGG RTG CGG CGT ATT AG 3´ y la del iniciador AR2 es 5´ CKG CTG GCA CAT AGT TAG CCRT 3´, donde K representa una mezcla de los nucleótidos G-T y R contiene A-G.

Amplificación de las muestras por PCR

Las muestras se amplificaron en un termociclador programable (Mini Cycler MJ Research, Inc. Watertown. M.A., USA). La mezcla de reacción contiene 10 mM de Tris-HCl (pH 8.5), 200 µM de cada dNTP's, 50 mM de KCl, 3.5 mM de MgCl₂, 2.5 U de enzima Taq polimerasa, 0.3 µM de cada iniciador (Gibco BRL), 4% de dimetilsulfoxido, 5 µl de la muestra a analizar y una gota de aceite mineral estéril, para un volumen final de 50 µl de muestra (Wong-Lee y Lovett, 1993).

La amplificación estuvo bajo el siguiente esquema: desnaturalización a 94° C durante un minuto, alineamiento a 50° C un minuto y polimerización a 72° C por 1 minuto (repetir 40 ciclos), finalmente se da una extensión a 72° C durante 5 minutos.

Electroforesis en gel de agarosa

Se preparó un gel al 2% teñido con una solución de bromuro de etidio (10 mg/ml), colocándose 8µl de cada uno de los productos amplificados más 2µl de azul de bromofenol, el corrimiento electroforético se realizó a 70 volts durante 1.5 horas y los

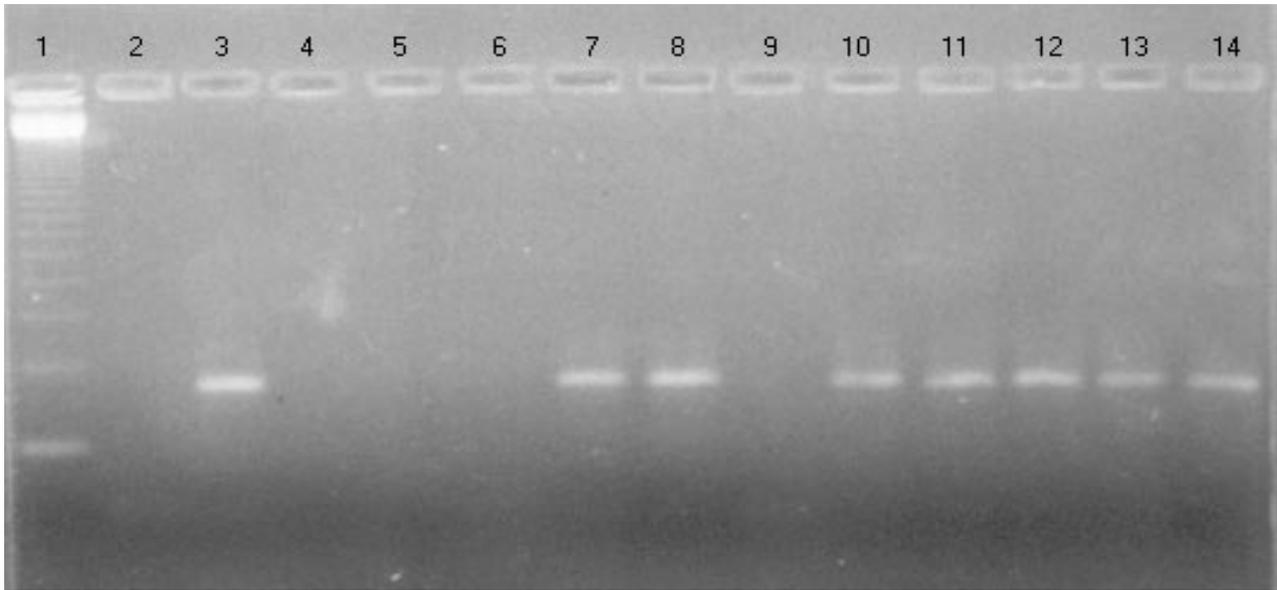


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio de los productos amplificados a partir de los extractos del ADN de las cepas de referencia y muestras de lavado externo y tracto digestivo de las moscas.

Línea 1: marcador de peso molecular (1 kb). Línea 2: control de reactivos. Línea 3: producto específico de 301 pb amplificado a partir de la cepa control *Mycoplasma fermentans* PG-18. Líneas: 4 y 5 ausencia del producto específico en el lavado externo de las moscas. Líneas: 6 y 9 muestras del lavado interno de las moscas mostrando ausencia del producto específico. Líneas: 7, 8, 10, 11, 12 y 13 muestran la presencia del producto específico amplificado a partir de *Mycoplasma fermentans* P-140, *Mycoplasma penetrans* GTU-54 y *Mycoplasma pirum*, respectivamente por duplicado. Línea 14: presenta el producto específico amplificado de *Mycoplasma pneumoniae*.

resultados se observaron con una lámpara de luz ultravioleta.

RESULTADOS

Las 700 muestras estudiadas resultaron negativas para el aislamiento a partir de la superficie externa e interna de las moscas, tanto en caldo SP-4 y agar Eaton, además la detección del fragmento de 301 pb para el género micoplasma por medio de la técnica de PCR fue negativa (Figura 1).

Las cepas de referencia presentaron actividad metabólica y multiplicación en caldo SP-4 a las 24 horas de incubación, y al ser transferidas al agar Eaton mostraron crecimiento colonial característico. La extracción de ADN de las cepas de referencia y su amplificación resultó positiva para la obtención del producto de 301 pb (Figura 1).

DISCUSIÓN

El papel de la mosca doméstica en la transmisión de microorganismos en áreas

rurales, urbanas y en ambientes hospitalarios ha permitido la implementación de medidas sanitarias para disminuir los riesgos que representan (Cohen *et al.*, 1991; Fotedar *et al.*, 1992; Khalil *et al.*, 1994).

Debido a que diferentes especies de micoplasmas se involucran con diversas enfermedades en animales y humanos, y que pueden llegar a provocar alteraciones más severas (Tully, 1993; Yáñez *et al.*, 1999), se considera de importancia el conocer los mecanismos que están involucrados en la dispersión de estos microorganismos.

Anticipando que los micoplasmas presentan dificultad para aislarse de diversas muestras (humanas, animales, insectos y plantas), se han desarrollado medios de cultivo enriquecidos; sin embargo muchas de las ocasiones los resultados son negativos para el aislamiento del microorganismo viable. Por tanto, se buscó detectar por medio de PCR el material genético del género micoplasma, con la finalidad de establecer si el microorganismo estuvo en algún momento presente en la mosca.

El aislamiento negativo de micoplasmas en la mosca doméstica, está

condicionado a la disposición de nutrientes y a las condiciones físicas y químicas del entorno donde éstos se puedan desarrollar (Black y Krafur, 1987; Ribeiro *et al.*, 1995). Sin embargo, se ha determinado que algunas especies de Spiroplasma, consideradas exclusivas de insectos y plantas, pueden llegar a causar daño severo en mamíferos (Tully *et al.*, 1977). Ya que se observó que la cepa SMCA de Spiroplasma puede causar daños como alteraciones en el sistema nervioso central, caracterizado por espasmos musculares, disturbio en el control motor, pérdida de apetito, disminución de peso,

hemorragias en cerebro, hígado y bazo conduciendo a la muerte en hámsters recién nacidos (Kirchhoff *et al.*, 1981). Se observó también que alteraciones similares son inducidas por *M. fermentans* y *M. pneumoniae* en chimpancés y hámsters, respectivamente (Barile *et al.*, 1988; Lo *et al.*, 1993b).

Considerando el papel tan importante que representan los micoplasmas en diferentes enfermedades, tanto en el humano como en animales, se plantea continuar estudiando los posibles mecanismos de dispersión de estos microorganismos.

LITERATURA CITADA

- ADEYEMI, O., AND O. DIPEOLU, 1984. The numbers and varieties of bacterial carried by filth flies in sanitary and unsanitary city area. *Int. J. Zoonoses*. 11: 195-203.
- BARILE, M.F., CHANDLER, D., YOSHIDA, H., GRABOWSKI, M., HARASAWA, R., AND S. RAZIN, 1988. Parameters of *Mycoplasma pneumoniae* infection in Syrian Hamsters. *Infect. Immun.* 56: 2443-2449.
- BLACK, W.C 4th, AND E. KRAFSUR, 1987. Fecundity and size in the housefly: investigations of some environmental sources and genetic correlates of variation. *Med. Vet. Entomol.* 1: 369-382.
- BRENNER, C., NEYROLLES, O., AND A. BLANCHARD, 1996. Mycoplasma and HIV infection: From epidemiology to their interaction with immune cells. *Front. Biosci.* 1: 42-54.
- COHEN, D., GREEN, M., BLOCK, C., SLEPON, R., AMBAR, R., AND S. WASSERMAN, 1991. Reduction of transmission of shigellosis by control of houseflies. *Lancet* 337: 993-997.
- ECHEVERRIA, P., HARRISON, A., TIRAPAT, C., AND A. McFARLAND, 1983. Flies as a source of enteric pathogens in a rural village in Thailand. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 32-36.
- FORSEY, T., AND S. DAROUGAR, 1981. Transmission of chlamydiae by the housefly. *Br. Ophthalmol.* 65: 147-150.
- FOTEDAR, R., BANERJEE, U., SINHG, S., SHIRINIWAS, AND A. VERMA, 1992. The housefly (*Musca domestica*) as a carrier of pathogenic microorganisms in a hospital environment. *J. Hosp. Infect.* 20: 209-215.
- GRUBEL, P., HOFFMAN, J., CHONG, K., BURSTEIN, A., MAPANI, C., AND D. CAVE, 1997. Vector potential of houseflies (*Musca domestica*) for *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 35: 1300-1303.
- HUSSAIN, I., ROBSON, W., KELLEY, R., REID, T., AND J. GANGEMI, 1999. *Mycoplasma penetrans* and other mycoplasmas in urine of human immunodeficiency virus-positive children. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1518-1523.
- KHALIL, K., LINDBLOM, G., MAZHAR, K., AND B. KAIJSER, 1994. Flies and water as reservoirs for bacterial enteropathogens in urban and rural areas in and around Lahore, Pakistan. *Epidemiol. Infect.* 113: 435-444.
- KHIN NEW, O., SEBASTINA, A., AND T. AYE, 1989. Carriage of enteric bacterial pathogens by house flies in Yangon, Myanmar. *J. Diarrhoeal. Dis. Res.* 7: 81-84.
- KIRCHHOFF, H., KUWABARA, T., AND M. BARILE, 1981. Pathogenicity of *Spiroplasma* sp. strain SMCA in Syrian hamsters: clinical, microbiological and histological aspects. *Infect. Immun.* 31: 445-452.
- LEVINE, O., AND M. LEVINE, 1991. Houseflies (*Musca domestica*) as mechanical vectors of shigellosis. *Rev. Infect. Dis.* 13: 688-696.
- LO, SC., HAYES, M., KOTANI, H., PIERCE, F., WEAR, J. AND PB 3rd NEWTON, 1993a. Adhesion onto and invasion into mammalian cells by *Mycoplasmas penetrans*: a newly isolated mycoplasma from patients with AIDS. *Mod. Pathol.* 6: 276-280.
- LO, SC., DOUGLAS, W., JAMES, K., WANG, H., NEWTON III PB., AND F. RODRIGUEZ, 1993b. Fatal systemic infections of nonhuman primates by *Mycoplasma fermentans* (incognitus strain). *Clin. Infect. Dis.* 17 Supl 1: 283-288.
- RAZIN, S., YOGEV, D., AND Y. NAOT, 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 1094-1156.
- RIBEIRO, C., DE SOUZA, M., AND C. LOMONACO, 1995. Influence of environmental factor on the size of *Musca domestica*. *Rev. Bras. Biol.* 55: 633-637.
- SALMAN, M., BOROVSKY, Zp6., AND S. ROTTEM, 1998. *Mycoplasma penetrans* infection of Molt-3 lymphocytes induces changes in the lipid composition of host cells. *Microbiol.* 144: 3447-3454.
- SHIDU, K., RASHIDBAIGI, A., TESTA, D., AND M-J. LIAO, 1995. Competitor internal standards for quantitative detection of mycoplasma DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 128: 207-712.
- SLOOT, N., HOLLANDT, H., GATERMANN, S., AND K. DALHOFF, 1996. Detection of Mycoplasma sp. in bronchoalveolar lavage of AIDS patients with pulmonary infiltrates. *Zentralbl. Bakteriol.* 284: 75-79.
- TSAI, S., WEAR, J., SHIH, W., AND SC. LO, 1995. Mycoplasma and oncogenesis: persistent infection and multistage malignant transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 24: 10197-10201.
- TULLY, JG. 1993. Current status of the Mollicutes flora of humans. *Clin. Infect. Dis.* 17 Supl 1: 2-9.

- TULLY, JG., WHITCOMB, F., CLARCK, F., AND L. WILLIAMSON, 1977. Pathogenic mycoplasmas: cultivation and vertebrate pathogenicity of a new Spiroplasma. *Science* 195: 892-894.
- WONG-LEE, JG., AND M. LOVETT, 1993. Rapid and sensitive PCR method for identification of Mycoplasma species in tissue culture. en: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ, editors. *Diagnostic Molecular Microbiology Principles and Applications*. Washington, D.C. American Society for Microbiology. pp. 257-60.
- YÁNEZ, A., CEDILLO, L., NEYROLLES, O., ALONSO, E., PREVOST, C., AND J. OJAS, 1999. *Mycoplasma penetrans* bacteremia and primary antiphospholipid syndrome. *Emerg. Infect. Dis.* 5: 164-167.
- YIRMIYA, R., BARAK, O., AVITSUR, R., GALLILY, R., AND J. WEIDENFELD, 1997. Intracerebral administration of *Mycoplasma fermentans* produced sickness behavior: role of prostaglandins. *Brain. Res.* 749: 71-81.