



**Universidad  
Europea** MADRID

**PROYECTO DE FIN DE GRADO**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD**

**GRADO EN BIOMEDICINA**

**DETECCIÓN DE *MYCOPLASMA* SPP. EN TORTUGAS  
MORA MEDIANTE RT-PCR Y SU POSIBLE POTENCIAL  
ZONÓTICO BAJO UN PUNTO DE VISTA “*ONE  
HEALTH*”**

Autora: Júlia Casajuana Murgui

Villaviciosa de Odón, 23 de mayo de 2025

## **ANEXO IX**

**Título del Trabajo:** Detección de *Mycoplasma* spp. en tortugas mora mediante RT-PCR y su posible potencial zoonótico bajo un punto de vista “*One Health*”.

Este trabajo ha sido realizado en el grupo de Investigación de Salud Global, en las instalaciones del Hospital Clínico de la Universidad Europea de Madrid.

**Tutor académico:** Dra. Claudia M. Parra Giraldo (Facultad de Ciencias Biomédicas y de la Salud, UEM) y la Dra. Bárbara Martín-Maldonado (Facultad de Ciencias Biomédicas y de la Salud, UEM).

**Tutor profesional:** Dr. Fernando Esperón Fajardo (Facultad de Ciencias Biomédicas y de la Salud, UEM).

## INFORMACIÓN DEL CENTRO

La realización del trabajo fin de grado (TFG) se ha llevado a cabo en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad Europea de Madrid, el cual atiende animales de compañía, caballos y animales exóticos. Trabaja con tecnología de última generación, dispone de quirófanos inteligentes, un equipo de resonancia magnética nuclear (RMN) y un equipo de Tomografía Axial Computarizada (TAC). A su vez, ofrece atención especializada en distintas áreas y cuenta con tres departamentos: un laboratorio de Microbiología, un laboratorio de Biopatología Clínica y un laboratorio de Biología Molecular (*Conoce El Hospital Clínico Veterinario de La Universidad Europea de Madrid, Con Servicio de Urgencias 24 Horas Los 365 Días Del Año - Mascotas, n.d.*) (*Hospital Clínico Veterinario UE - Hospital Veterinario Madrid 24 Horas, n.d.*).

El equipo de profesionales veterinarios son de alto prestigio ya que son “Especialistas Diplomados” por el Colegio Europeo de sus especialidades y son acreditados en su especialidad por la Asociación de Veterinarios Españoles en Pequeños Animales (AVEPA) (*Conoce El Hospital Clínico Veterinario de La Universidad Europea de Madrid, Con Servicio de Urgencias 24 Horas Los 365 Días Del Año - Mascotas, n.d.*).

### Grupo de Investigación en Salud Global – Universidad Europea de Madrid

El Grupo de Investigación en Salud Global de la Universidad Europea de Madrid es un equipo multidisciplinar de investigadores dedicado al abordaje de las enfermedades infecciosas mediante el enfoque "*One Health*" (Una Salud), integrando las perspectivas de salud humana, animal y ambiental.

El grupo está formado por el Dr. Fernando Esperón Fajardo, la Dra. Bárbara Martín-Maldonado y la Dra. Claudia Marcela Parra Giraldo, expertos en enfermedades infecciosas veterinarias y humanas, entre otros investigadores. Tanto el Dr. Fernando Esperón como la Dra. Claudia Marcela Parra Giraldo son investigadores senior con más de 70 publicaciones revisadas por pares cada uno y una amplia experiencia de liderazgo en proyectos de investigación multiinstitucionales a nivel nacional e internacional.

# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>5</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>6</b>
2.1 GENERALIDADES DE GÉNERO <i>MYCOPLASMA</i> .....	6
2.2 <i>MYCOPLASMA</i> SPP. EN SALUD HUMANA .....	6
2.3. <i>MYCOPLASMA</i> SPP. EN MEDICINA VETERINARIA Y FAUNA SILVESTRE .....	7
2.4. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD .....	8
2.5. POSIBLE ZONOSIS DEL GÉNERO <i>MYCOPLASMA</i> .....	11
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
<b>4. METODOLOGÍA.....</b>	<b>15</b>
4.1. RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS Y EXTRACCIÓN DE ADN DE TORTUGAS MORA .	15
4.2. DETECCIÓN DE <i>M. AGASSIZII</i> Y <i>M. TESTUDIUM</i> MEDIANTE RT-PCR .....	15
4.3. ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> E INTERPRETACIÓN DEL ÁRBOL FILOGENÉTICO .....	16
<b>5. RESULTADOS/DISCUSIÓN .....</b>	<b>17</b>
5.1 DETECCIÓN DE <i>MYCOPLASMA</i> SPP. MEDIANTE RT-PCR.....	17
5.2. RELACIÓN FILOGENÉTICA DE LAS LIPOPROTEÍNAS EN DISTINTOS MICOPLASMAS ..	19
5.3. ENFOQUE ODS/SOSTENIBILIDAD .....	21
<b>6. CONCLUSIÓN .....</b>	<b>22</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>24</b>

## 1. RESUMEN

La enfermedad respiratoria superior (URTD) en tortugas ha adquirido un papel relevante en medicina veterinaria y conservación. Hasta la fecha, se ha identificado *Mycoplasma agassizii* y *Mycoplasma testudineum* como agentes etiológicos principales de la URTD en tortugas mora (*Testudo graeca*) en cautiverio o salvajes. El aumento de las interacciones humanas con especies silvestres, en contextos domésticos o veterinarios, sugiere la hipótesis de un posible potencial patogénico de *M. agassizii* en humanos bajo un punto de vista “*One Health*”. Los objetivos que presenta este estudio se centran en la detección mediante PCR en tiempo real (RT-PCR) de *Mycoplasma* spp. (*M. agassizii* y *M. testudineum*) en tortugas mora y posteriormente, el análisis comparativo de la lipoproteína de *M. pneumoniae* y *M. agassizii* mediante el desarrollo de un árbol filogenético. La selección de la lipoproteína en *M. pneumoniae* se basó en la capacidad que presenta por colonizar el tracto respiratorio superior en humanos, igual que *M. agassizii*, pero en tortugas.

El 44% de las muestras fueron positivas sintomáticas para *Mycoplasma* spp. (*M. agassizii* y *M. testudineum*), respaldando su papel etiológico en la URTD. Sin embargo, no se encontró ninguna relación evolutiva entre las lipoproteínas de *M. agassizii* y las *M. pneumoniae*, ni entre otras especies *Mycoplasma*. Por este motivo, este estudio no puede afirmar el posible potencial patogénico de *M. agassizii* en humanos.

**Palabras clave:** *Mycoplasma agassizii*, *Mycoplasma pneumoniae*, lipoproteína, RT-PCR, análisis *in silico*, árbol filogenético.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Generalidades de género *Mycoplasma*

En la década de los 90 se conocía muy poco sobre la existencia de micoplasmas. De hecho, inicialmente se les llamaba “organismos similares a la pleuroneumonía” o *pleuropneumonia-like organisms* (PPLO), ya que se les atribuía la etiología de la pleuroneumonía bovina en animales vacunados y eran considerados de naturaleza vírica. No fue hasta 1931 cuando, mediante cultivo en medios de agar, se determinó que se trataba de bacterias, debido a la formación de colonias muy pequeñas con crecimiento denso en el centro y más tenue en la periferia, con aspecto característico de “huevo frito” (Rufo et al., 2021).

El género *Mycoplasma* está formado por un gran número de especies consideradas en su mayoría, parásitos intracelulares facultativos, con un genoma muy pequeño que alberga aproximadamente 580~2200 kb (You et al., 2006). *Mycoplasma* pertenece a la clase de *Mollicutes*, los cuales se caracterizan por carecer de pared celular y por tener una capacidad metabólica muy limitada. Dicha limitación se explica por la gran ausencia de genes responsables de sintetizar componentes esenciales, promoviendo la dependencia metabólica por su hospedador natural, con el fin de obtener metabolitos como los aminoácidos, los nucleótidos y el colesterol (Sirand-Pugnet et al., 2007). La ausencia de pared celular les permite ser resistentes a los antibióticos convencionales como los betalactámicos y a la vancomicina. Suelen generar resistencia adquirida a los antibióticos, por lo que es muy importante administrarlos únicamente cuando se conoce la especie en cuestión. En muchos casos actúan como comensales de mucosas, pero tienen la capacidad de inducir patologías en condiciones de inmunodepresión. En este contexto suponen un riesgo para los humanos, ya que son muy difíciles de detectar, generan resistencias y son de crecimiento lento (Combaz & Kuhn, 2017).

### 2.2 *Mycoplasma* spp. en salud humana

En 1937 se aisló por primera vez *Mycoplasma hominis* en humanos. Este hallazgo, permitió conocer que varias especies de *Mycoplasma* forman parte de la flora bacteriana humana ya que se comportan como agentes comensales. No obstante, pueden convertirse en patógenos oportunistas en ciertas situaciones, sobre todo bajo circunstancias de estrés o de inmunodepresión (Combaz & Kuhn, 2017). Desde entonces, se han descrito

múltiples especies de *Mycoplasma* implicadas en patologías humanas, especialmente en los tractos genital y respiratorio. Hasta la fecha, se conocen varias especies capaces de colonizar el tracto urogenital y ororrespiratorio. A nivel del tracto ororrespiratorio, aunque existen diversas especies como *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma salivarium* y *Mycoplasma pirum*, sólo *Mycoplasma pneumoniae* está claramente establecido como patógeno respiratorio en humanos por producir neumonía atípica. Por otro lado, las especies con diana genital incluyen *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma primum*, *Mycoplasma penetrans* y *Mycoplasma spermatophilum*. De estas, *Mycoplasma genitalium* y *Ureaplasma urealyticum* presentan un claro potencial patogénico, mientras que *Mycoplasma hominis* y *Mycoplasma penetrans* se consideran potencialmente patógenas en condiciones específicas, como en la vaginosis bacteriana (Taylor-Robinson & Furr, 1998).

### 2.3. *Mycoplasma* spp. en medicina veterinaria y fauna silvestre

En medicina veterinaria los micoplasmas poseen una alta relevancia tanto en animales de ganado como en fauna silvestre. Se han reportado casos donde los micoplasmas son responsables de la mayoría de las enfermedades respiratorias y articulares de alta morbilidad en cerdos y aves (Baudler et al., 2019). No obstante, el interés por el estudio de *Mycoplasma* spp. en reptiles, se centra en las tortugas, específicamente en las del desierto Agassiz (*Gopherus agassizii*) y en especies europeas como la tortuga mora (*Testudo graeca*) y la tortuga mediterránea (*Testudo hermanni*).

Aunque se identificaron diferentes especies de *Mycoplasma*, todas compartían la capacidad de causar infecciones respiratorias del tracto superior (URTD), principalmente *M. testudineum*. La creciente prevalencia llevó a importantes disminuciones poblacionales, especialmente en el desierto de Mojave, donde la tortuga del desierto Agassiz fue declarada especie en peligro. Este contexto propició el descubrimiento de *M. agassizii* como nueva especie responsable de URTD, tanto en tortugas terrestres salvajes como en cautiverio (Jacobson et al., 2014). Las lesiones en las cavidades nasales originadas por *M. agassizii* son más agresivas que las generadas por *M. testudineum* (Jacobson et al., 2014). También se ha documentado la presencia de *Mycoplasma* spp. mediante la reacción en cadena polimerasa (PCR) convencional y la RT-PCR en otras especies de tortugas, como en las tortugas de caja del este (*Terrapene carolina carolina*)

y en las tortugas de Blanding (*Emydoidea blandingii*) (Sim et al., 2016) (Winter et al., 2020). En Europa, también se ha identificado *M. agassizii* en tortugas mora cautivas, en concreto en España, donde se estima que un 6% de los casos positivos corresponde a esta especie y se sospecha una posible coinfección con herpesvirus quelónido (ChHV) (Salinas et al., 2011).

Una característica esencial de las tortugas terrestres es la excavación de madrigueras profundas, lo que proporciona un entorno microclimático ideal no sólo para su refugio, sino también el de diversas especies de vertebrados; incluyendo serpientes, aves, e invertebrados; englobando arañas, grillos y escarabajos (Brown et al., 1999). Por este motivo, no sólo presentan un papel relevante en el ecosistema, sino que el comercio de tortugas como mascotas o la liberación descontrolada de ejemplares infectados, ha favorecido la dispersión de *M. agassizii* entre tortugas y el establecimiento de nuevas cepas patógenas en ecosistemas, poniendo en riesgo las poblaciones silvestres (DuPre' et al., 2011).

Aunque *M. agassizii* no se ha identificado como agente infeccioso en humanos, su posible similitud estructural con otras especies de *Mycoplasma* humanas, plantea interrogantes sobre su potencial zoonótico. La realización de un análisis *in silico* de proteínas implicadas en la adherencia celular podría evidenciar una semejanza entre estos factores, resultando en un riesgo emergente. Dicho riesgo, pone en manifiesto la necesidad de generar una planificación sanitaria entorno a la fauna silvestre y cautiva, para prevenir casos de transmisión cruzada entre especies animales y humanas.

#### 2.4. Mecanismos de patogenicidad

El principal mecanismo de patogenicidad de *Mycoplasma* spp. se basa en su capacidad de adhesión a distintos epitelios mediante la interacción específica de adhesinas y lipoproteínas de membrana con receptores específicos. Estas proteínas permiten la unión a las estructuras diana y la capacidad de modular la respuesta inmunitaria del hospedador conllevando a un estado de inflamación crónica y a un daño progresivo en las estructuras colonizadas (Jacobson et al., 2014). Los estudios de los mecanismos virulencia de *M. pneumoniae*, han permitido el hallazgo de la presencia de fracciones lipídicas en sus lipoproteínas. Estas fracciones, conservadas en la mayoría de las especies de

*Mycoplasma*, actúan como potentes inmunoestimuladores, promoviendo la activación celular y la expresión del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) mediante la interacción con receptores tipo Toll (TLR), específicamente los heterodímeros TLR1/2 y TLR2/6 (You et al., 2006). Esta unión promueve la liberación de citoquinas proinflamatorias, como el factor de crecimiento tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), la proteína inflamatoria de macrófagos-1 $\beta$  (MIP-1 $\beta$ ), la interleucina-6 (IL-6), la proteína alfa regulada por el crecimiento (GRO- $\alpha$ ) y la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) (Benedetti et al., 2020). Posteriormente, se produce la activación de la vía NF- $\kappa$ B, la migración celular y el reclutamiento de células como los granulocitos, linfocitos y macrófagos. Finalmente, todos estos eventos conducen a la activación de la caspasa-3, componente principal de la vía apoptótica, que conlleva a una menor viabilidad celular y a un aumento de la lisis celular (You et al., 2006) (Zuo et al., 2009) (Saha et al., 2025).

Por otro lado, otro componente clave en la patogenicidad de los micoplasmas, son las adhesinas, las cuales no sólo ejercen un papel fundamental en la adhesión celular, sino que también son responsables de la inmunogenicidad. Concretamente, la adhesina p1 de *M. pneumoniae* le permite la adhesión al epitelio respiratorio humano mediante el reconocimiento específico de receptores que contienen ácido siálico. La proteína p1 interactúa con un complejo de adhesión y con proteínas accesorias como p30 y HMW1, estableciendo un anclaje eficiente formando estructuras citoadhesivas conocidas como "tip structures" (Chourasia et al., 2014). Estas estructuras permiten la expresión de toxinas específicas como la toxina CARDS (*community-acquired respiratory distress syndrome*), capaces de modular el inflammasoma NLRP3 (*NLR family CARD domain containing 3*) y aumentar la producción de interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), citocina proinflamatoria clave en la génesis del daño tisular prolongado (Saha et al., 2025) (Lopez-Castejon & Brough, 2011). Por otro lado, *M. hominis* presenta factores de adherencia como las proteínas p50 y p100 claves para su fijación a células eucariotas (Henrich et al., 1993), o en el caso de *Mycoplasma hyorhinis*, contiene la proteína p37 responsable de incrementar el proceso de invasión y metástasis de células tumorales en diversos tipos de cáncer como el cáncer gástrico y el cáncer pulmonar (Yang et al., 2010). Asimismo, *M. hominis* presenta la proteína Vaa, la cual promueve la diseminación intracelular y al mismo tiempo, es capaz de incrementar la toxicidad local al metabolizar la arginina generando amoníaco (Henrich et al., 1993).

La variedad de adhesinas presentes en las especies de *Mycoplasma* se relaciona con las adaptaciones moleculares específicas que se han ido confiriendo en las diferentes especies, otorgándoles la capacidad específica de reconocer y unirse a distintos hospedadores (Rosengarten et al., 2000). En la **Tabla 1**, se describen las principales adhesinas presentes en las distintas especies de *Mycoplasma*.

<b>Especie de <i>Mycoplasma</i></b>	<b>Hospedador principal</b>	<b>Adhesina(s) principal(es)</b>	<b>Genes involucrados</b>	<b>Función principal</b>	<b>Referencia</b>
<i>M. pneumoniae</i>	Humanos	P1 adhesina, P30, HMW1	<i>P1</i>	Adhesión al epitelio respiratorio humano vía receptores con ácido siálico	(Cao et al., 2011); (Dumke et al., 2007)
<i>M. genitalium</i>	Humanos	MgPa adhesina	<i>mgpB, mgpC</i>	Adhesión a células urogenitales; variación antigénica para evasión inmune	(Ma et al., 2007)
<i>M. gallisepticum</i>	Aves (pollos, pavos)	GapA, CrmA	<i>gapA, crmA</i>	Adhesión al tracto respiratorio aviar; formación de estructuras citoadhesivas	(Fujisawa et al., 2019)
<i>M. agalactiae</i>	Rumiantes pequeños	Vpma ( <i>Variable surface proteins</i> )	<i>vpma</i> , regulados por <i>xer1</i>	Adhesión variable al epitelio; evasión del sistema inmune mediante variación antigénica	(Cacciotto et al., 2010)
<i>M. mycoides subsp. capri</i>	Caprinos	MIB-MIP system (captura de IgG)	<i>mib, mip</i>	Unión y degradación de inmunoglobulinas caprinas; evasión de respuesta inmune	(Jores et al., 2020)

<i>M. bovis</i>	Bovinos	Vsp ( <i>Variable surface proteins</i> )	<i>vsp family</i>	Variación antigénica para evasión inmune; adhesión al epitelio respiratorio y mamario	(Lysnyansky et al., 1999)
<i>M. suis</i>	Cerdos	Unida a eritrocitos (proteína no identificada)	–	Adhesión a eritrocitos porcinos; mecanismo poco caracterizado	(Hoelzle et al., 2007)
<i>M. hominis</i>	Humanos	P120 y otras proteínas de membrana	<i>p120</i> , otros genes hipotéticos	Adhesión a células epiteliales urogenitales; implicado en infecciones oportunistas	(Férandon et al., 2013)

**Tabla 1.** Tabla descriptiva donde se especifican las adhesinas presentes en cada especie de *Mycoplasma*, sus genes involucrados, su función principal y sus hospedadores

### 2.5. Posible zoonosis del género *Mycoplasma*

Como se ha mencionado anteriormente, *Mycoplasma* spp. se caracteriza por su genoma de pequeño tamaño, por su ausencia de pared celular y por presentar una alta especificidad por su hospedador. Sin embargo, se han documentado casos aislados de micoplasmas específicos de animales en humanos. Por esta razón, se plantea la posibilidad de que algunos micoplasmas pueden actuar como agentes zoonóticos en contextos de inmunosupresión, contacto estrecho con animales domésticos o silvestres, en ambientes de laboratorio o de protectoras donde los animales están en cautividad (Rufo et al., 2021). En la **Tabla 2** se exponen los micoplasmas específicos de animales que se han aislado en humanos.

<b>Patógeno</b>	<b>Aislamiento en humanos</b>
<i>M. amphoriforme</i>	Se aisló por primera vez en un paciente con inmunodepresión y bronquitis crónica.
<i>M. arginini</i>	Los casos investigados sospechan que el reservorio es de origen animal, ya que se aislaron en personas que trabajan con fauna animal.
<i>M. arthritidis</i>	Aislado en pacientes con coinfección de <i>M. pneumoniae</i> y <i>M. hominis</i> . Esta coinfección aumenta la virulencia de <i>M. arthritidis</i> .
<i>M. bovis</i>	Aislado en una mujer que había estado en contacto con un fertilizante producido a partir de estiércol de vaca. No obstante, la mujer presentaba infección por <i>M. pneumoniae</i> , lo que sugiere que la infección por <i>M. bovis</i> surgió de forma oportunista, característica típica de infección por ganado bovino.
<i>M. canis</i>	Aislado en un paciente tras sufrir una mordedura de perro.
<i>M. edwardii</i>	Forma parte del tracto respiratorio superior y urogenital de los perros, ya que se aisló en un niño con peritonitis polimicrobiana que tenía un perro como mascota.
<i>M. faucium</i>	Aislado en pacientes con defecto sinusal o dental, en abscesos cerebrales o abscesos diseminados con inmunodeficiencia primaria, y en procesos de gastritis crónica.
<i>M. felis</i>	Aislado en una mujer tras sufrir una mordedura de gato.
<i>M. fermentans</i>	Aislamiento por transmisión cruzada en ambientes hospitalarios o en laboratorios, aunque su papel como posibles patógenos zoonóticos se desconoce.
<i>M. hyorhinis</i>	Aislado en pacientes con cáncer.
<i>M. maculosum</i>	Sólo existe un único aislamiento en un paciente inmunodeprimido que con el tiempo desarrolló meningitis.
<i>M. ovis</i>	Aislado en veterinarios y personas que trabajan con animales.
<i>M. phocicerebrale</i>	Único patógeno de reservorio animal que afecta regularmente a los humanos, sobre todo al estar en contacto con focas.
<i>M. pirum</i>	Aislado en pacientes con SIDA, pero se desconocen sus implicaciones clínicas.
<i>M. pulmonis</i>	Aislado en dos casos con personas con contacto con ratas de forma habitual.
<i>M. suis</i>	Aislado en trabajadores de granjas de cerdos.

**Tabla 2.** Especies de *Mycoplasma* descritos en posibles casos de infección zoonótica (Rufo et al., 2021)

El presente estudio se centra en la característica común que presentan *M. pneumoniae* y *M. agassizii* por colonizar el tracto respiratorio. En este contexto, la reciente identificación de la lipoproteína-17 en *M. agassizii* (Mani et al., 2011), cuyo papel aún se desconoce, plantea la hipótesis de una posible homología funcional o estructural con la lipoproteína presente en *M. pneumoniae*, extraída de la base de datos *GeneBank* con número de referencia WP\_159243969. Dicha hipótesis, podría situar a *M. agassizii* como un agente etiológico con potencial zoonótico, capaz de causar infecciones en humanos.

Los resultados obtenidos en este estudio son interpretados bajo un enfoque “*One Health*”, en la que la salud animal, humana y el medio ambiente están interconectadas. La cercanía de los campos permite establecer nuevos métodos de vigilancia y control de enfermedades.

### 3. OBJETIVOS

La prevalencia de la enfermedad URTD en tortugas mora (*Testudo graeca*) ha aumentado durante los últimos años. Por esta razón, el presente estudio plantea como objetivo general la identificación de *M. agassizii*, uno de los agentes etiológicos principales de la URTD, mediante RT-PCR.

Los objetivos específicos son los siguientes:

- Búsqueda de secuencias de lipoproteínas presentes en *M. agassizii* y *M. pneumoniae* para conocer su posible relación evolutiva.
- Estudio comparativo de la lipoproteína de *M. pneumoniae* y *M. agassizii* mediante el desarrollo de un árbol filogenético.
- Explorar la homología de las lipoproteínas anteriormente descritas con otras especies de *Mycoplasma*.
- Interpretación de los resultados bajo un enfoque “*One Health*” para evaluar el posible potencial patogénico de *M. agassizii* en humanos.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1. Recolección de las muestras y extracción de ADN de tortugas mora

Las muestras fueron obtenidas mediante hisopos nasofaríngeos durante el periodo en que las tortugas mora se encontraban en cautiverio, y se clasificaron en función del sitio de alojamiento que se encontraban. La extracción del ADN procedente de tortugas se llevó a cabo empleando el *QuickGene DNA Tissue Kit S* (Fujifilm). El procedimiento se inició con la adición de 20 µL de la proteinasa K (reactivo EDT), 180 µL del buffer de lisis (reactivo MDT) y 300 µL de la muestra de ADN en un eppendorf estéril. A continuación, se agitó en vórtex durante 15 minutos. Posteriormente, se introdujo 250 µL del buffer de lisis (reactivo LDT), se agitó durante 10 segundos y se añadieron 3 µL de ARN *carrier* para después volverlo a agitar durante 10 segundos. Seguidamente, se incubó primero en un bloque térmico a 70 °C durante 10 minutos, y después se sometieron a una segunda incubación a 95 °C durante 2 minutos. Una vez finalizadas las incubaciones, se añadieron 250 µL de etanol absoluto en cada eppendorf y se introdujo en el vórtex durante 10 segundos para finalmente transferir la mezcla a una columna de purificación. El proceso de lavado consistió en tres adiciones consecutivas de 750 µL del reactivo buffer de lavado (reactivo WDT). Por último, se desecharon los tubos colectores y las columnas se introdujeron sobre nuevos tubos eppendorf estériles y se añadieron 50 µL del buffer de elución (reactivo CDT). Se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto y se presurizó para eluir el material genético. Las muestras fueron almacenadas a -70 °C hasta la realización de los siguientes análisis.

### 4.2. Detección de *M. agassizii* y *M. testudium* mediante RT-PCR

La detección de *Mycoplasma* spp. se llevó a cabo mediante una RT-PCR. Se añadió de forma consecutiva 10 µL del reactivo *Kappa Master Mix 2x* (Roche), 0'1 µL de los *primers Mtortoise-F* (20 µM) y *Mtortoise-R* (20 µM) (Condalab) y 5'8 µL de agua libre de ADN. Finalmente, se añadió 4 µL de las muestras biológicas extraídas anteriormente. Los tiempos para PCR fueron: 3' a 95°C, 50 ciclos x (15'' 95°C, 30'' 65°C).

Se incluyeron controles negativos, los cuales sólo presentaban agua libre de ADN, para garantizar la fiabilidad de los resultados. Las muestras se clasificaron como positivas o negativas, en función de la amplificación del material genético antes del ciclo 37 (CT<

37). Para la comprensión de los resultados, se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos: presencia de secreción y grupo al que pertenecen.

#### 4.3. Análisis *in silico* e interpretación del árbol filogenético

La secuencia de la lipoproteína de *M. pneumoniae* (también propuesto como *Mycoplasma pneumoniae* en recientes revisiones taxonómicas) (código *GeneBank* WP\_159243969) se extrajo de la base de datos pública *GeneBank* mediante el *software* *MEGA*. Se repitió el mismo procedimiento con la lipoproteína de *M. agassizii* (código *GeneBank* WP\_159444234).

El alineamiento entre ambas secuencias se realizó mediante la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) y se buscaron otras secuencias con un porcentaje de cobertura superior al 50% y con un nivel de similitud suficientemente representativo para el estudio. Las secuencias de las lipoproteínas seleccionadas en distintas especies fueron las siguientes: *Mycoplasma sp. HU2014* (código *GeneBank* KNG79313), *Mycoplasma crocodyli* (código *GeneBank* ADE19925), *Mycoplasma feriruminatoris* (código *GeneBank* UKS53694), *Mycoplasma leachii* (código *GeneBank* WP\_013447919), *Mycoplasma capricolum* (código *GeneBank* WP\_158514660), *Mycoplasma putrefaciens KSI* (código *GeneBank* AEM68490), *Mycoplasma tauri* (código *GeneBank* QSB07243), *Mycoplasma todarodis* (código *GeneBank* CAM9131788), *Mycoplasma putrefaciens KSI* (código *GeneBank* AEM68991), *Mycoplasma yeatsii* (código *GeneBank* AJM72103), *Mycoplasma cottewii* (código *GeneBank* UWD35294), *Mycoplasma mycoides subsp. capri* (código *GeneBank* QVK04793), *Mycoplasma mycoides* (código *GeneBank* WP\_080512637) y *Mycoplasma marinum* (código *GeneBank* CAM9129023).

Para la estimación de la fiabilidad estadística del árbol filogenético se usó el método *bootstrap*, estableciendo como valores indicativos aquellos que presentan un valor superior a 70.

## 5. RESULTADOS/DISCUSIÓN

### 5.1 Detección de *Mycoplasma* spp. mediante RT-PCR

De las 87 muestras analizadas, el 77% resultaron positivas para *Mycoplasma* spp. (*M. agassizii* y *M. testudineum*). Entre las tortugas positivas, un 45% presentaban secreción nasal con infección respiratoria, mientras que el restante resultaron asintomáticas. En cuanto a los ejemplares con resultado negativo para *Mycoplasma* spp., los cuales abarcaban el 23% del total; un alto porcentaje no presentaban sintomatología, concretamente el 75% de ellos. A pesar de esto, un 25%, correspondiente a 5 casos, sí manifestaban signos clínicos.

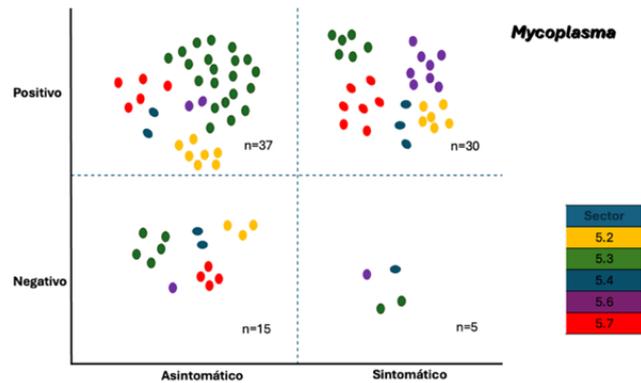
Los datos obtenidos, reflejados en la **Figura 1**, respaldan la implicación de *Mycoplasma* spp., en concreto *M. agassizii* y *M. testudineum*, en la etiología de la rinitis en tortugas, ya que el 77% resultaron positivas. Este porcentaje se asemeja con otros estudios documentados (Brown et al., 2001) (Benedetti et al., 2020) (Brown et al., 1999). Sin embargo, el 55% de las tortugas positivas no manifestaron secreción nasal, lo que plantea la hipótesis de que la presencia de *Mycoplasma* spp. no se asocia de forma única con la manifestación clínica de la enfermedad.

Es importante tener en cuenta que los micoplasmas son comensales oportunistas, es decir, forma parte de la microbiota de la mayor parte de los animales, como los mamíferos y los reptiles. Por este motivo, es posible que diversos factores externos, como factores ambientales o factores interindividuales e intraindividuales, afecten en mayor medida al crecimiento exponencial de *Mycoplasma* spp. y, por lo tanto, a la aparición de los síntomas (Combaz & Kuhn, 2017) (Sandmeier et al., 2013).

Asimismo, la técnica de RT-PCR detecta tanto *M. agassizii* como *M. testudineum*, por lo que no se puede garantizar que los casos positivos sean causados específicamente por *M. agassizii*. Para poder establecer un diagnóstico diferencial, se deberían llevar a cabo pruebas complementarias, como el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA), el cual permitiría la detección de anticuerpos específicos frente a *M. agassizii*.

La presencia de casos negativos, pero con secreción nasal, indica la presencia de otros agentes etiológicos capaces de producir un cuadro clínico similar. Concretamente, estos patógenos son otras especies de *Mycoplasma* (McLaughlin et al., 2000), Herpesvirus

(Marschang et al., 1997), *Pasteurella testudinis* spp. (Snipes & Biberstein, 1982) o Iridovirus (Jacobson & Garner, 2021).



**Figura 1.** Representación gráfica de la distribución de los casos positivos y negativos de *Mycoplasma* spp., así como de los casos sintomáticos y asintomáticos

Mediante la **Figura 2**, se exponen los resultados obtenidos, dividiendo los casos en función de la distribución de las tortugas en los sectores de las instalaciones de origen. Los datos sugieren que la distribución de las tortugas durante la recogida de la muestra biológica podría haber influido en el diagnóstico. Concretamente, las tortugas que se encuentran en el sector 5.6, a diferencia de los otros sectores, presentan un porcentaje mayor de casos positivos con manifestación clínica de la enfermedad. Esta discrepancia puede indicar la presencia de una cepa más virulenta de *Mycoplasma* spp., o ser indicativo de una mayor sensibilidad por parte de esa población al patógeno, habiendo podido influir factores individuales o el entorno. En conjunto, las condiciones de ese determinado sector predisponen a las tortugas a una mayor vulnerabilidad frente a *Mycoplasma* spp. Los resultados obtenidos exponen la necesidad de realizar investigaciones más exhaustivas para determinar la causa de esta alta prevalencia.

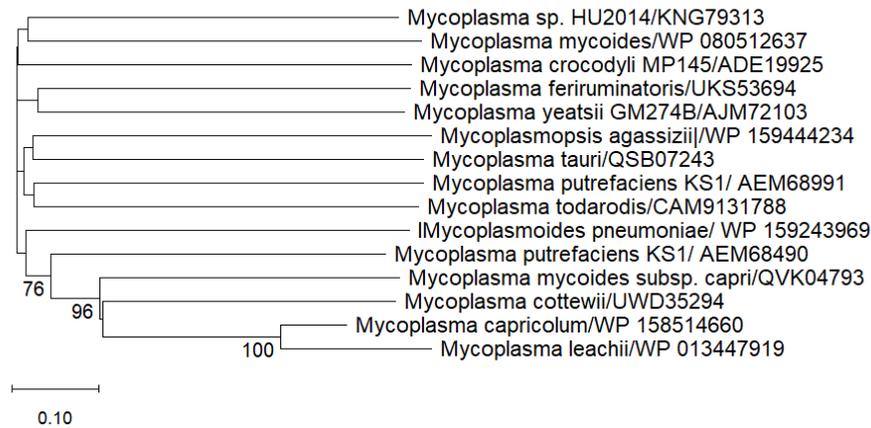
Sector	Sector 5.2	Sector 5.3	Sector 5.4	Sector 5.6	Sector 5.7	Total
<b>Total Positivas</b>	13	27	5	10	12	<b>67</b>
<b>Positivas sintomáticas</b>	6	6	3	8	7	<b>30</b>
<b>Positivas asintomáticas</b>	7	21	2	2	5	<b>37</b>
<b>Total Negativas</b>	3	7	3	2	4	<b>19</b>
<b>Negativas sintomáticas</b>	0	2	1	1	0	<b>4</b>
<b>Negativas asintomáticas</b>	3	5	2	1	4	<b>15</b>
<b>Total Tortugas</b>	17	34	8	12	16	<b>87</b>

**Figura 2.** Número de tortugas positivas y negativas, tanto sintomáticas como asintomáticas, distribuidas por sectores

### 5.2. Relación filogenética de las lipoproteínas en distintos micoplasmas

El árbol filogenético (**Figura 3**), construido a partir del análisis *in silico* de las secuencias de lipoproteínas presentes en las distintas especies del género *Mycoplasma* spp., expone a simple vista un clado con un valor máximo de *bootstrap* (*bootstrap* = 100). Concretamente, se encuentra formado por las bacterias *M. leachii* y *M. capricolum*, indicando una alta similitud entre las secuencias de sus lipoproteínas. Al mismo tiempo, este grupo presenta relación con las lipoproteínas de *M. cottewii* y *M. mycoides subsp. capri*, formando así un subgrupo filogenéticamente próximo (*bootstrap* = 96). Estos resultados sugieren una posible relación evolutiva, así como una función biológica de la lipoproteína secuenciada similar.

Por otro lado, *M. pneumoniae* y *M. putrefaciens KSI* (código *GeneBank* AEM68490) forman otro clado totalmente separado del resto de especies, indicando una mayor divergencia evolutiva. Asimismo, se observan agrupaciones intermedias entre *M. tauri*, *M. todarodis*, *M. putrefaciens KSI* (código *GeneBank* AEM68991) y *M. yeatsii*, pero no reflejan valores de *bootstrap* significativos, lo que impide afirmar que presentan un patrón evolutivo similar de la lipoproteína. Ocurre lo mismo entre *Mycoplasma* sp. HU2014, *M. crocodyli*, y *M. feriruminatoris*.



**Figura 3.** Árbol filogenético de las distintas lipoproteínas presentes en *Mycoplasma spp.* Figura realizada mediante el *software MEGA*

El árbol filogenético revela que no existe ninguna relación evolutiva significativa entre la secuencia de la lipoproteína de *M. pneumoniae* con la secuencia de la lipoproteína de *M. agassizii*. Aunque ambas especies presentan afinidad por el tracto respiratorio, no se ha encontrado homología estructural entre sus lipoproteínas. Sin embargo, ocurre lo contrario con la lipoproteína de *M. leachii* y la lipoproteína de *M. capricolum*, donde ambas presentan una elevada similitud de secuencias (*bootstrap* = 100). La homología estructural observada, puede deberse al hecho que ambas especies son específicas de hospedadores bovinos o pequeños rumiantes (Thankappan et al., 2017). Esto mismo sucede con *M. mycoides subsp. capri*, *M. cottewii* y *M. capricolum*, ya que las tres infectan a ganado (Manso-Silván et al., 2007).

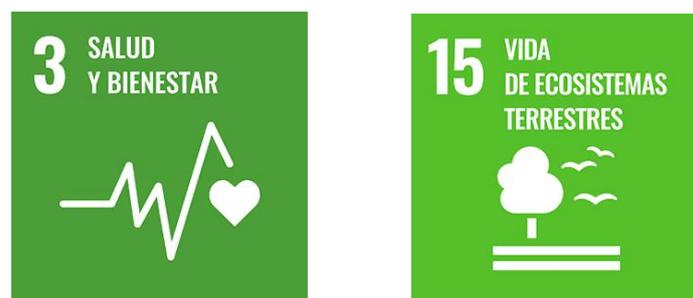
No obstante, las especies de *Mycoplasma sp. HU2014*, *M. crocodyli*, *M. feriruminatoris* y *M. yeatsii*, se encuentran representadas en ramas más externas, formando clados con valores bajos de *bootstrap*, sugiriendo que sus secuencias de lipoproteínas divergen significativamente. Aunque el análisis filogenético expone una diferencia evolutiva entre las lipoproteínas analizadas de *M. feriruminatoris* y *M. mycoides*, la literatura científica ha mostrado que ambas especies comparten características y factores de virulencia (Baby et al., 2023). Esta situación realza la participación de una gran variedad de factores esenciales para la colonización del tejido diana. La divergencia evolutiva representada de la especie de *M. crocodyli* con respecto a las demás (*Mycoplasma sp. HU2014*, *M. crocodyli*, *M. feriruminatoris* y *M. yeatsii*), respalda las investigaciones previas donde se indica que *M. crocodyli* es un patógeno de cocodrilos, por su reciente aislamiento en pulmones y articulaciones (Kirchhoff et al., 1997). En cambio, el resto de las especies

comparadas, son específicas de mamíferos. Basándonos en la bibliografía, *M. yeatsii* junto con *M. cottewii* y *M. putrefaciens*, presentan una relación filogenética con *M. mycoides*, formando una agrupación micoplasmática (Calcutt et al., 2016). Sin embargo, se contradice con lo observado en la **Figura 3**. Esta discrepancia evidencia, una vez más, la participación de un gran número de genes responsables de la codificación de distintas proteínas de superficie implicadas en la adherencia celular y patogenicidad. Al mismo tiempo, la necesidad de adaptación al hospedador, así como el entorno, influyen directamente en la evolución de estas proteínas (Sirand-Pugnet et al., 2007).

Cabe mencionar que la agrupación generada entre *M. agassizii* y *Mycoplasma tauri sp. nov* no es representativa, puesto que no presentan valores de *bootstrap* significativos para respaldar su validez. Aunque pudiera existir relación evolutiva en las secuencias de sus lipoproteínas, este estudio no puede confirmarla. La especificidad de ambas especies es totalmente distinta, ya que *M. agassizii* infecta a tortugas, mientras que *M. tauri sp. nov.* se ha aislado en ganado bovino (Spergser et al., 2022).

### 5.3. Enfoque ODS/sostenibilidad

La exposición a *Mycoplasma spp.*, responsable de la enfermedad respiratoria superior, ha incrementado a lo largo de los años en las poblaciones de tortugas y es responsable de la presente disminución de dicha población. Por esta razón, se considera que está íntimamente relacionada con el objetivo 15 ODS (Vida de ecosistemas terrestres) (**Figura 4**), pues su finalidad es proteger, restaurar y promover el uso sostenible de los ecosistemas terrestres, así como de detener la pérdida de biodiversidad. Además, el posible papel zoonótico de *M. agassizii*, debido a su afinidad por el mismo tejido que *M. pneumoniae*, se asocia con el objetivo 3 ODS (Salud y bienestar), ya que pretende garantizar una vida sana y promover el bienestar, tanto humano como animal.



**Figura 4.** Objetivo de desarrollo sostenible. De izquierda a derecha: ilustración ODS 3; ilustración ODS 15 (Objetivos y Metas de Desarrollo Sostenible - Desarrollo Sostenible, n.d.)

## 6. CONCLUSIÓN

La detección de *Mycoplasma* spp. en tortugas mora mediante RT-PCR ha permitido respaldar la hipótesis de que, tanto *M. agassizii* como *M. testudineum*, son dos agentes relevantes en la etiología de la enfermedad respiratoria superior (URTD). Los resultados obtenidos exponen una elevada proporción de ejemplares positivos sintomáticos, lo que refuerza la idea inicial. Sin embargo, la presencia de casos positivos asintomáticos, sugiere que situaciones externas, como factores ambientales, inmunológicos o interindividuales, influyen en la sintomatología de la enfermedad. Por otra parte, la presencia de tortugas negativas sintomáticas sugiere la participación de otros patógenos como Herpesvirus, *P. testudinis* spp. o Iridovirus, capaces de producir un cuadro clínico similar. Es importante tener en cuenta que la recolección de las muestras se realizó mientras las tortugas se encontraban en cautiverio y distribuidas en distintos sectores, pudiendo influir en los resultados obtenidos, ya que la proximidad entre ellas y su agrupación pueden relacionarse con la transmisión del patógeno.

Las diferencias evolutivas representadas mediante el árbol filogenético, evidencian la necesidad de adaptación de las proteínas de adhesión celular por su hospedador. Al mismo tiempo, el análisis de las diferentes lipoproteínas seleccionadas, demuestra que el mecanismo de colonización de la bacteria, está compuesto por una gran variedad de factores moleculares, poniendo en manifiesto la complejidad del estudio entre especies. Por tanto, la caracterización y la identificación de todas las proteínas implicadas en la patogenicidad de los micoplasmas supone un gran desafío científico.

Al no encontrarse ninguna homología estructural entre *M. agassizii* y *M. pneumoniae*, no se pudo determinar su posible potencial patogénico en humanos, aunque se propone realizar futuras investigaciones, con el objetivo de identificar a nivel molecular sus factores de virulencia y patogenicidad. El presente vacío científico de *M. agassizii* ha limitado la interpretación de los resultados, así como las conclusiones de este estudio, debido a la escasa bibliografía científica. Por esta razón, se incentiva a seguir investigando y se propone que se lleven a cabo estudios con un enfoque multidisciplinar en el ámbito de enfermedades infecciosas en la fauna silvestre, y, como en este caso, en especies vulnerables como es la tortuga mora. El reciente crecimiento de la interacción animal-humano, pone en manifiesto la necesidad de llevar a cabo medidas sanitarias específicas

para minimizar el riesgo de transmisión de enfermedades zoonóticas en la población humana.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Baby, V., Ambroset, C., Gaurivaud, P., Falquet, L., Boury, C., Guichoux, E., Jores, J., Lartigue, C., Tardy, F., & Sirand-Pugnet, P. (2023). Comparative genomics of *Mycoplasma feriruminatoris*, a fast-growing pathogen of wild Caprinae. *Microbial Genomics*, 9(10). <https://doi.org/10.1099/MGEN.0.001112>
- Baudler, L., Scheufen, S., Ziegler, L., Möller Palau-Ribes, F., Ewers, C., & Lierz, M. (2019). Identification and differentiation of avian *Mycoplasma* species using MALDI-TOF MS. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 31(4), 620–624. <https://doi.org/10.1177/1040638719856932>
- Benedetti, F., Curreli, S., & Zella, D. (2020a). Mycoplasmas–Host Interaction: Mechanisms of Inflammation and Association with Cellular Transformation. *Microorganisms*, 8(9), 1351. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8091351>
- Benedetti, F., Curreli, S., & Zella, D. (2020b). Mycoplasmas–host interaction: Mechanisms of inflammation and association with cellular transformation. *Microorganisms*, 8(9), 1–21. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8091351>
- Brown, M. B., Brown, D. R., Klein, P. A., McLaughlin, G. S., Schumacher, I. M., Jacobson, E. R., Adams, H. P., & Tully, J. G. (2001). *Mycoplasma agassizii* sp. nov., isolated from the upper respiratory tract of the desert tortoise (*Gopherus agassizii*) and the gopher tortoise (*Gopherus polyphemus*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(2), 413–418. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-2-413>
- Brown, M. B., McLaughlin, G. S., Klein, P. A., Crenshaw, B. C., Schumacher, I. M., Brown, D. R., & Jacobson, E. R. (1999). Upper respiratory tract disease in the gopher tortoise is caused by *Mycoplasma agassizii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(7), 2262–2269. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.7.2262-2269.1999>
- Cacciotto, C., Addis, M. F., Pagnozzi, D., Chessa, B., Coradduzza, E., Carcangiu, L., Uzzau, S., Alberti, A., & Pittau, M. (2010). The liposoluble proteome of *Mycoplasma agalactiae*: an insight into the minimal protein complement of a bacterial membrane. *BMC Microbiology*, 10(1), 225. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-225/FIGURES/6>

- Calcutt, M. J., Kent, B. N., & Foecking, M. F. (2016). Complete genome sequence of *Mycoplasma yeatsii* strain GM274B (ATCC 43094). *Genome Announcements*, 3(2). <https://doi.org/10.1128/GENOMEA.00328-15>
- Cao, B., Song, S., Yin, Y., Zhao, F., Li, J., Tao, X., He, L., & Zhang, J. (2011). Sequence Variation within the P1 Gene of *Mycoplasma pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(10), 3723. <https://doi.org/10.1128/JCM.01318-11>
- Chourasia, B. K., Chaudhry, R., & Malhotra, P. (2014). Delineation of immunodominant and cytoadherence segment(s) of *Mycoplasma pneumoniae* P1 gene. *BMC Microbiology*, 14(1), 108. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-108>
- Combaz, N., & Kuhn, A. (2017). A Systematic Review of *Mycoplasma* and *Ureaplasma* in Urogynaecology. *Geburtshilfe Und Frauenheilkunde*, 77(12), 1299. <https://doi.org/10.1055/S-0043-119687>
- Conoce el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad Europea de Madrid, con servicio de urgencias 24 horas los 365 días del año - Mascotas. (n.d.). Retrieved May 23, 2025, from <https://www.interempresas.net/Mascotas/Articulos/585258-Conoce-Hospital-Clinico-Veterinario-Universidad-Europea-Madrid-servicio-urgencias-24.html>
- Dumke, R., Schurwanz, N., Lenz, M., Schuppler, M., Lück, C., & Jacobs, E. (2007). Sensitive Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in Human Respiratory Tract Samples by Optimized Real-Time PCR Approach. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 45(8), 2726–2730. <https://doi.org/10.1128/JCM.00321-07>
- DuPre', S. A., Tracy, C. R., & Hunter, K. W. (2011). Quantitative PCR method for detection of *Mycoplasma* spp. DNA in nasal lavage samples from the desert tortoise (*Gopherus agassizii*). *Journal of Microbiological Methods*, 86(2), 160–165. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2011.04.017>
- Férandon, C., Peuchant, O., Renaudin, H., & Bébéar, C. (2013). Diversity of *Mycoplasma hominis* clinical isolates from Bordeaux, France, as assessed by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *BMC Microbiology*, 13(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-120/FIGURES/1>
- Fujisawa, S., Murata, S., Takehara, M., Katakura, K., Hmoon, M. M., Win, S. Y., & Ohashi, K. (2019). Molecular detection and genetic characterization of *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, and infectious bronchitis virus in poultry in Myanmar. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 261. <https://doi.org/10.1186/S12917-019-2018-2>

- Henrich, B., Feldmann, R. C., & Hadding, U. (1993). Cytoadhesins of *Mycoplasma hominis*. *Infection and Immunity*, *61*(7), 2945–2951. <https://doi.org/10.1128/IAI.61.7.2945-2951.1993>
- Hoelzle, K., Grimm, J., Ritzmann, M., Heinritzi, K., Torgerson, P., Hamburger, A., Wittenbrink, M. M., & Hoelzle, L. E. (2007). Use of recombinant antigens to detect antibodies against *Mycoplasma suis*, with correlation of serological results to hematological findings. *Clinical and Vaccine Immunology*, *14*(12), 1616–1622. <https://doi.org/10.1128/CVI.00345-07/ASSET/1AC5E772-FE92-4C68-9665-421852C079A8/ASSETS/GRAPHIC/ZCD0120731180003.JPEG>
- Hospital Clínico Veterinario UE - Hospital Veterinario Madrid 24 horas*. (n.d.). Retrieved May 23, 2025, from <https://hospitalveterinario.universidadeuropea.com/>
- Jacobson, E. R. ., & Garner, M. M. . (2021). *Infectious diseases and pathology of reptiles : color atlas and text*.
- Jacobson, E. R., Brown, M. B., Wendland, L. D., Brown, D. R., Klein, P. A., Christopher, M. M., & Berry, K. H. (2014). Mycoplasmosis and upper respiratory tract disease of tortoises: A review and update. *Veterinary Journal*, *201*(3), 257–264. <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2014.05.039>
- Jores, J., Baldwin, C., Blanchard, A., Browning, G. F., Colston, A., Gerdts, V., Goovaerts, D., Heller, M., Juleff, N., Labroussaa, F., Liljander, A., Muuka, G., Nene, V., Nir-Paz, R., Sacchini, F., Summerfield, A., Thiaucourt, F., Unger, H., Vashee, S., ... Salt, J. (2020). Contagious Bovine and Caprine Pleuropneumonia: a research community’s recommendations for the development of better vaccines. *NPJ Vaccines*, *5*(1), 66–66. <https://doi.org/10.1038/S41541-020-00214-2>
- Kirchhoff, H., Mohan, K., Schmidt, R., Runge, M., Brown, D. R., Brown, M. B., Foggin, C. M., Muvavarirwa, P., Lehmann, H., & Flossdorf, J. (1997). *Mycoplasma Crocodyli* sp. nov., a new species from crocodiles. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *47*(3), 742–746. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-3-742/CITE/REFWORKS>
- Lopez-Castejon, G., & Brough, D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1β secretion. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, *22*(4), 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.10.001>
- Lysnyansky, I., Sachse, K., Rosenbusch, R., Levisohn, S., & Yogev, D. (1999). The vsp locus of *Mycoplasma bovis*: Gene organization and structural features. *Journal of Bacteriology*, *181*(18), 5734–5741. <https://doi.org/10.1128/JB.181.18.5734->

[5741.1999/ASSET/60DD8ABB-5EF6-40E8-8AD6-](#)

[71A9B05602E4/ASSETS/GRAPHIC/JB1890625004.JPEG](#)

- Ma, L., Jensen, J. S., Myers, L., Burnett, J., Welch, M., Jia, Q., & Martin, D. H. (2007). Mycoplasma genitalium: An efficient strategy to generate genetic variation from a minimal genome. *Molecular Microbiology*, 66(1), 220–236. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2007.05911.X;CTYPE:STRING:JOURNAL>
- Mani, R., Vorobiev, S., Swapna, G. V. T., Neely, H., Janjua, H., Ciccocanti, C., Xiao, R., Acton, T. B., Everett, J. K., Hunt, J., & Montelione, G. T. (2011). Solution NMR and X-ray crystal structures of membrane-associated Lipoprotein-17 domain reveal a novel fold. *Journal of Structural and Functional Genomics*, 12(1), 27–32. <https://doi.org/10.1007/S10969-010-9099-2>
- Manso-Silvan, L., Perrier, X., & Thiaucourt, F. (2007). Phylogeny of the Mycoplasma mycoides cluster based on analysis of five conserved protein-coding sequences and possible implications for the taxonomy of the group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(10), 2247–2258. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.64918-0>
- Marschang, R. E., Gravendyck, M., & Kaleta, E. F. (1997). Herpesviruses in Tortoises: Investigations into Virus Isolation and the Treatment of Viral Stomatitis in Testudo hermanni and T. graeca. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 44(7), 385–394. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0450.1997.TB00989.X;WGROU:STRING:PUBLICATION>
- McLaughlin, G. S., Jacobson, E. R., Brown, D. R., McKenna, C. E., Schumacher, I. M., Adams, H. P., Brown, M. B., & Klein, P. A. (2000). PATHOLOGY OF UPPER RESPIRATORY TRACT DISEASE OF GOPHER TORTOISES IN FLORIDA. *Journal of Wildlife Diseases*, 36(2), 272–283. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-36.2.272>
- Rosengarten, R., Citti, C., Glew, M., Lischewski, A., Droee, M., Much, P., Winner, F., Brank, M., & Spergser, J. (2000). Host-pathogen interactions in mycoplasma pathogenesis: Virulence and survival strategies of minimalist prokaryotes. *International Journal of Medical Microbiology*, 290(1), 15–25. [https://doi.org/10.1016/S1438-4221\(00\)80099-5](https://doi.org/10.1016/S1438-4221(00)80099-5)
- Rufo, D. G., Sanchez, E. G., Sanchez, J. E. G., & Moro, M. G. (2021). Implicaciones clnicas de las especies del gnero Mycoplasma. *Revista Española de Quimioterapia*, 34(3), 169. <https://doi.org/10.37201/REQ/014.2021>

- Saha, S., Sachivkina, N., Kuznetsova, O., Neborak, E., & Zhabo, N. (2025). Elucidating the Role of Nrf2 Signaling Pathway in Mycoplasma Infections. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 30(4). <https://doi.org/10.31083/FBL28286>
- Salinas, M., Francino, O., Sánchez, A., & Altet, L. (2011). Mycoplasma and Herpesvirus PCR Detection in Tortoises with Rhinitis-stomatitis Complex in Spain. *Journal of Wildlife Diseases*, 47(1), 195–200. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-47.1.195>
- Sandmeier, F. C., Tracy, C. R., Hagerty, B. E., Dupré, S., Mohammadpour, H., & Hunter, K. (2013). Mycoplasmal upper respiratory tract disease across the range of the threatened Mojave desert tortoise: Associations with thermal regime and natural antibodies. *EcoHealth*, 10(1), 63–71. <https://doi.org/10.1007/S10393-013-0835-5>
- Sim, R. R., Allender, M. C., Crawford, L. K., Wack, A. N., Murphy, K. J., Mankowski, J. L., & Bronson, E. (2016). Ranavirus Epizootic in Captive Eastern Box Turtles (*Terrapene Carolina Carolina*) with Concurrent Herpesvirus and Mycoplasma Infection: Management and Monitoring. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 47(1), 256–270. <https://doi.org/10.1638/2015-0048.1>
- Sirand-Pugnet, P., Lartigue, C., Marena, M., Jacob, D., Barré, A., Barbe, V., Schenowitz, C., Mangenot, S., Couloux, A., Segurens, B., De Daruvar, A., Blanchard, A., & Citti, C. (2007). Being Pathogenic, Plastic, and Sexual while Living with a Nearly Minimal Bacterial Genome. *PLoS Genetics*, 3(5), e75. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.0030075>
- Snipes, K. P., & Biberstein, E. L. (1982). *Pasteurella testudinis* sp. nov.: A parasite of desert tortoises (*Gopherus agassizi*). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 32(2), 201–210. <https://doi.org/10.1099/00207713-32-2-201/CITE/REFWORKS>
- Spargser, J., DeSoye, P., Ruppitsch, W., Cabal Rosel, A., Dinhopf, N., Szostak, M. P., Loncaric, I., Chopra-Dewasthaly, R., & Busse, H. J. (2022). *Mycoplasma tauri* sp. nov. isolated from the bovine genital tract. *Systematic and Applied Microbiology*, 45(1), 126292. <https://doi.org/10.1016/J.SYAPM.2021.126292>
- Taylor-Robinson, D., & Furr, P. M. (1998). Update on sexually transmitted mycoplasmas. *Lancet*, 351(SUPPL.3), 12–15. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(98\)90004-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(98)90004-6)
- Thankappan, S., Rana, R., Remesh, A. T., Rekha, V., Nagaleekar, V. K., & Puvvala, B. (2017). Cloning and expression of P67 protein of *Mycoplasma leachii*. *Veterinary World*, 10(9), 15. <https://doi.org/10.14202/VETWORLD.2017.1108-1113>

- Winter, J. M., Mumm, L., Adamovicz, L. A., Andersson, K. E., Glowacki, G. A., & Allender, M. C. (2020). CHARACTERIZING the EPIDEMIOLOGY of HISTORIC and NOVEL PATHOGENS in BLANDING'S TURTLES (EMYDOIDEA BLANDINGII). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 51(3), 606–617. <https://doi.org/10.1638/2019-0154>
- Yang, H., Qu, L., Ma, H., Chen, L., Liu, W., Liu, C., Meng, L., Wu, J., & Shou, C. (2010). Mycoplasma hyorhinis infection in gastric carcinoma and its effects on the malignant phenotypes of gastric cancer cells. *BMC Gastroenterology*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-10-132>
- You, X. xing, Zeng, Y. hua, & Wu, Y. mou. (2006). Interactions between mycoplasma lipid-associated membrane proteins and the host cells. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 7(5), 342–350. <https://doi.org/10.1631/JZUS.2006.B0342/METRICS>
- Zuo, L. L., Wu, Y. M., & You, X. X. (2009). Mycoplasma lipoproteins and Toll-like receptors. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 10(1), 67. <https://doi.org/10.1631/JZUS.B0820256>