

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



IMPLEMENTACION DEL DIAGNOSTICO DE
Mycoplasma gallisepticum Y *Mycoplasma synoviae*
MEDIANTE PCR-RFLP EN AVES DE PRODUCCION

POR
ALICIA GUADALUPE MARROQUIN CARDONA

TESIS
Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS
con especialidad en Salud Animal.

JUNIO 2005

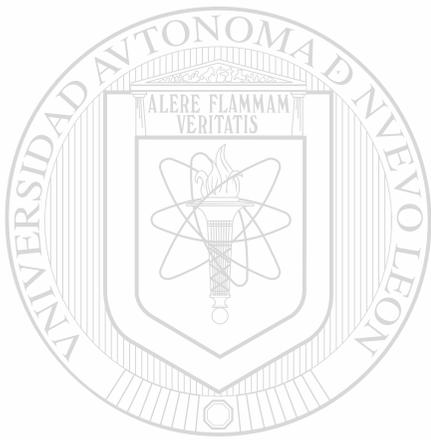
TM

SF995

.M3

2005

c.1



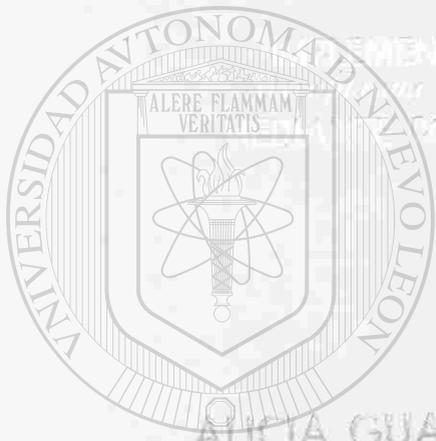
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



IMPLEMENTACIÓN DEL DIAGNÓSTICO DE
Salmonella pullorum y *Salmonella agona*
POR RFLP EN AVES DE PRODUCCIÓN

UANL
POR
ALICIA GUADALUPE MARRQUIN CARDONA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

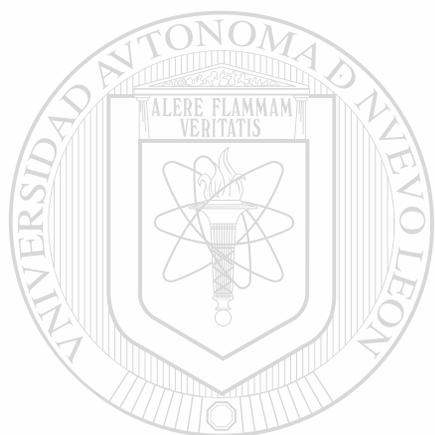
TESIS

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS
con especialidad en Salud Animal.

2010



TM
SF995
-M3
2005



UANL

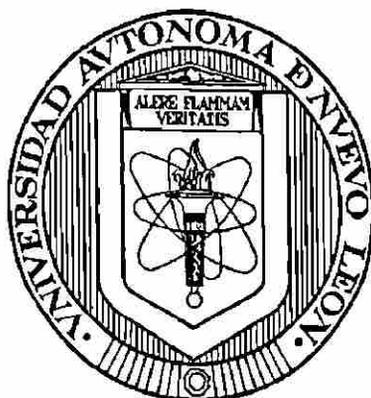
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**IMPLEMENTACIÓN DEL DIAGNÓSTICO DE *Mycoplasma*
gallisepticum Y *Mycoplasma synoviae* MEDIANTE
PCR-RFLP EN AVES DE PRODUCCIÓN**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Por

ALICIA GUADALUPE MARROQUÍN CARDONA

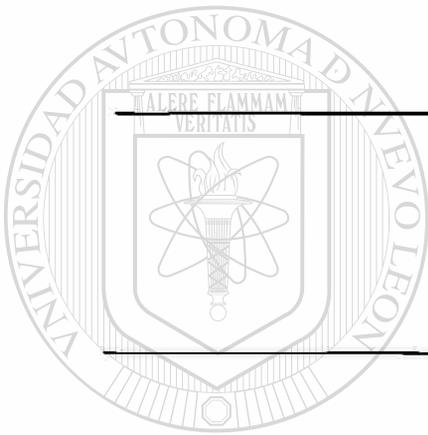
TESIS

**Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS
con Especialidad en Salud Animal**

JUNIO, 2005

IMPLEMENTACIÓN DEL DIAGNÓSTICO DE *Mycoplasma gallisepticum* Y *Mycoplasma synoviae* MEDIANTE PCR-RFLP EN AVES DE PRODUCCIÓN

Aprobación por el comité de Tesis:



Dr. José Antonio Salinas Meléndez
Asesor principal

Dr. Ramiro Ávalos Ramírez
Co-asesor

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

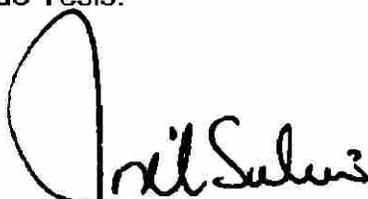
Dr. Víctor Manuel Riojas Valdés
Co-asesor

Dr. Guillermo Dávalos Aranda
Co-asesor

MC. Juan Carlos Valladares de la Cruz
Co-asesor

IMPLEMENTACIÓN DEL DIAGNÓSTICO DE *Mycoplasma gallisepticum* Y *Mycoplasma synoviae* MEDIANTE PCR-RFLP EN AVES DE PRODUCCIÓN

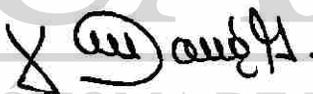
Aprobación por el jurado de Tesis:



Dr. José Antonio Salinas Meléndez
Presidente

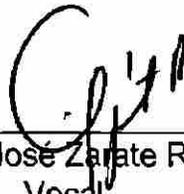


Dr. Francisco A. Santoyo De Estefano
Secretario

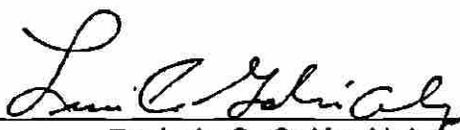


Dr. Alfredo Wong González
Vocal

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



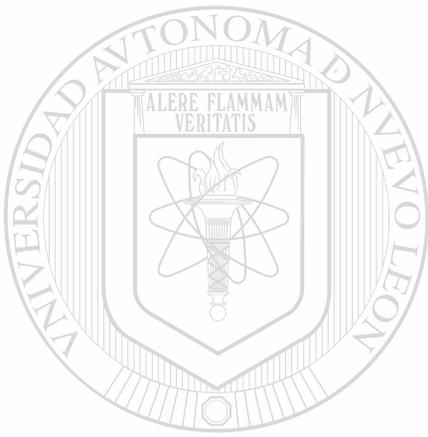
Dr. Juan José Zarate Ramos
Vocal



Dr. Luis C. Galán Alejo
Vocal

DEDICATORIA

Con especial cariño a mi esposo José Francisco García y a mi hijo Damián García



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo, le agradezco a la vida por permitirme coincidir con todas las personas y organismos que habitan en este tiempo.

A la Facultad de Medicina Veterinaria, por que siento un enorme cariño por mi escuela. A mis papás por demostrarme de mil formas el amor que me tienen. A mis alumnos por que aprendo muchísimo de ellos y me han dado la oportunidad de transmitirles algo de lo poco que sé.

En especial le doy las gracias a todos mis maestros que a lo largo de conocerlos he aprendido cosas valiosas que me sirven y servirán en la vida.

Particularmente, agradezco al Dr. José A. Salinas, al Dr. Víctor Riojas, al Dr. Ramiro Ávalos, al MC. Juan C. Valladares, a mi padrino el Dr. Rafael Ramírez y al MC. Juan Carlos Gómez, de quienes he aprendido mucho y que me han apoyado siempre.

Agradezco a la Universidad Autónoma de Nuevo León por la aprobación del proyecto PAYCYT 2002, del cual se obtuvieron los fondos para el financiamiento de la investigación y a la Dirección de la FMVZ por el apoyo que me brindaron.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes.....	5
1.1.1 Historia.....	5
1.1.2 Etiología.....	7
1.2 Epizootiología.....	12
1.2.1 Distribución geográfica.....	12
1.2.2 Especies afectadas.....	12
1.2.3 Transmisión.....	13
1.2.4 Signos clínicos.....	16
1.2.5 Patogenia.....	17
1.2.5.1 Lesiones macroscópicas.....	18
1.2.5.2 Lesiones microscópicas.....	19
1.2.6 Diagnóstico.....	21
1.2.7 Tratamiento.....	25
1.2.8 Prevención y control.....	27
1.3 Hipótesis.....	29
1.4 Objetivos.....	30
1.4.1 Objetivo general.....	30
1.4.2 Objetivos particulares.....	30
1.5 Metas.....	31

2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	32
2.1 Lugar de realización de la investigación.....	32
2.2 Procedencia de las muestras.....	32
2.3 Obtención de las muestras.....	34
2.3.1 Obtención de muestras clínicas.....	34
2.3.2 Obtención de muestras empleadas como controles.....	35
2.4 Obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN).....	35
2.4.1 Obtención de ADN a partir de antígenos y vacunas comerciales.....	35
2.4.2 Obtención de ADN a partir de muestras clínicas.....	36
2.5 Protocolo para PCR-RFLP.....	37
2.5.1 Dilución de los iniciadores.....	37
2.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa.....	38
2.5.3 Visualización de productos amplificados.....	40
2.5.4 Digestión con <i>Hpa</i> I.....	41
2.5.5 Visualización de productos de digestión.....	42
2.6 Estimación del límite de detección del PCR.....	43
2.7 Eficacia del PCR-RFLP para distinción molecular de MG y MS....	43
2.8 Mezcla de reacción de 50µl.....	44
2.9 Cultivo de vacunas comerciales y muestras clínicas.....	44
2.9.1 Preparación del medio.....	45
2.9.2 Inoculación de microorganismos.....	45
3. RESULTADOS.....	47

3.1 Resultados de la obtención de ADN	47
3.1.1 ADN de antígenos y vacunas comerciales.....	47
3.1.2 ADN de muestras clínicas.....	48
3.2 Resultados de vacunas comerciales.....	49
3.2.1 Productos amplificados y digeridos a partir de vacunas comerciales.....	49
3.3 Resultados de muestras clínicas.....	50
3.3.1 Productos amplificados y digeridos a partir de muestras clínicas.....	50
3.4 Resultados de la estimación del límite de detección.....	55
3.5 Resultados de la eficacia del PCR-RFLP para la distinción molecular de MG y MS.....	56
3.6 Resultados para las mezclas de reacción de 50µl.....	57
<hr/>	
3.7 Resultados del cultivo de vacunas comerciales y muestras clínicas.....	59
4. DISCUSIÓN.....	63
5. CONCLUSIONES.....	69
LITERATURA CITADA.....	72
APÉNDICE.....	85
A. Material y equipo.....	86
B. Preparación de soluciones.....	90

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Fotografía de colonias de <i>Mycoplasma gallisepticum</i>	9
2	Secuencia reconocida por <i>Hpa</i> I.....	42
3	ADN a partir de antígeno comercial.....	48
4	ADN a partir de vacunas.....	48
5	Productos amplificados de vacunas comerciales.....	49
6	Productos de corte de vacunas.....	50
7	Productos amplificados a partir de muestras clínicas.....	52
8	Fragmentos de corte a partir de muestras clínicas	53
9	Fragmentos de corte a partir de muestras clínicas	54
10	Productos de amplificación a partir de diluciones.....	55
11	Productos amplificados a partir de ADN mezclado.....	56 [®]
12	Fragmentos de corte a partir de ADN mezclado.....	57
13	Productos amplificados de mezcla de reacción de 50µl.....	58
14	Fragmentos de corte a partir de mezcla de reacción de 50µl.....	58
15	Crecimiento de micoplasmas en tubos de cultivo.....	59
16	Productos amplificados de vacunas cultivadas.....	60
17	Fragmentos de corte de vacunas cultivadas.....	61

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Especies de Micoplasmas que infectan pollos	7
II	Principales propiedades bioquímicas de MG y MS.....	10
III	Cepas empleadas en Nuevo León para control de MG y MS.....	11
IV	Susceptibilidad a antibióticos de MG y MS.....	26
V	Procedencia de las muestras y tipo de muestreo.....	33
VI	Ingredientes de la mezcla de PCR.....	39
VII	Programa para Termociclador.....	39
VIII	Resultados del PCR-RFLP.....	51

ABREVIATURAS

16S ARNr Gen codificante para fracción de ARNr 16S

[] Concentración

µg Microgramos

µl Microlitro

µM Micromolar

Abs Absorbancia

ADN Ácido Desoxirribonucleico

ARN Ácido Ribonucleico

ARNr ARN ribosomal

ATP Adenosin trifosfato

BE Bromuro de etidio

DNTP's Dinucleotidos trifosfatados

EDTA Ácido Etilen Diamino Tetracético

ELISA Inmunoensayo Ligado a Enzima

FMVZ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

g Gramos

H₂O UPE Agua Ultra Pura Estéril

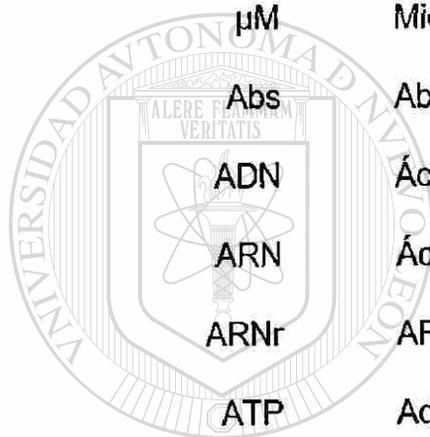
Kb Kilobases

l Litros

M Concentración Molar

mg Miligramo

MG *Mycoplasma gallisepticum*



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



MgCl ₂	Cloruro de magnesio
ml	Mililitros
mM	Milimolar
MS	<i>Mycoplasma synoviae</i>
NaCl	Cloruro de sodio
ng	Nanogramos
nM	Nanomoles
pb	Pares de Bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de iones hidrógeno
pmol	Picomoles
rpm	Revoluciones por minuto
RFLP's	Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción
SNAP	Nucleótidos cortos marcados con fosfatasa alcalina
Taq	<i>Termus aquaticus</i>
TBE	Tris Borato EDTA
TE	Tris EDTA
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UCC	Unidades Cambiadoras de Color
UnIVEIGen	Unidad de Investigación Veterinaria en Enfermedades Infecciosas y Genética
UV	Ultravioleta

RESUMEN

Alicia Guadalupe Marroquín Cardona Fecha de Graduación: Junio 2005

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Unidad de Investigación Veterinaria en Enfermedades Infecciosas y Genética

Título del Estudio: **IMPLEMENTACIÓN DEL DIAGNÓSTICO DE
Mycoplasma gallisepticum Y *Mycoplasma synoviae* POR
PCR-RFLP EN AVES DE PRODUCCIÓN**

Número de Páginas: 100

Candidato para el grado de Maestría en
Ciencias Veterinarias con especialidad en
Salud Animal

Área de Estudio: **Enfermedades Infecciosas**

Propósito y Método de Estudio: La infección por *Mycoplasma gallisepticum* (MG) y *Mycoplasma synoviae* (MS) es de gran importancia en aves comerciales ya que provoca pérdidas económicas por bajas en la producción aunado a los costos de medicación. La mayoría de las veces se diagnostica mediante serología, lo que no permite diferenciar entre aves que alojan al agente y los que solo generaron inmunidad. En el presente estudio se analizaron mediante la técnica de PCR-RFLP muestras de aves comerciales para detectar la presencia de micoplasmas en éstas. La investigación propuso los siguientes objetivos:

- i.- Establecer la metodología para la detección molecular de MS y MG en aves por medio de PCR-RFLP.
- ii.- Comparar los resultados de serología y PCR-RFLP de las muestras analizadas.
- iii.- Evaluar la aplicación de la prueba para el análisis de muestras clínicas.

Las muestras empleadas en el estudio incluían el antecedente de positividad a micoplasmas mediante serología. Para el PCR-RFLP se obtuvo ADN a partir de exudado traqueal mediante lavados con PBS para después verificar su aislamiento corriendo por electroforesis un gel de agarosa al 0.8% posteriormente teñido con Bromuro de etidio para visualizarlo en transiluminador con luz UV. El ADN se sometió a la Reacción en Cadena de la Polimerasa para posteriormente verificar el tamaño del fragmento obtenido en agarosa al 2% comparándolo con un marcador de peso molecular. Los productos amplificados fueron después sometidos a digestión con la enzima *Hpa* I obteniendo productos de diferentes tamaños lo que permite diferenciar entre MG y MS. Todas las imágenes de los gels realizados fueron visualizadas y grabadas en un foto documentador Fluor S Multimager. Con los datos obtenidos se pudo determinar que la prueba de PCR-RFLP es capaz de detectar animales que alojan alguno de los dos micoplasmas y que es viable amplificarlos y diferenciarlos mediante esta técnica.

Contribuciones y conclusiones: Los resultados permitieron valorar la eficacia de los iniciadores para amplificar una región en común para ambos micoplasmas a partir del ADN control tomado de las vacunas vivas. Además los datos obtenidos de las muestras clínicas comerciales revelan la probable efectividad de los programas de vacunación y sanidad que se han venido realizando en las parvadas de reproductoras.

FIRMA DEL ASESOR: _____

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

La gran demanda de alimentos de origen animal que existe en la actualidad, ha dado lugar al surgimiento de explotaciones altamente tecnificadas con el propósito de aumentar la producción. Paralelo a este desarrollo, en la tecnología aplicada a la producción animal, se han sumado una creciente necesidad de diagnosticar y controlar las enfermedades que afectan a los animales utilizados para consumo humano.

En el caso de las explotaciones avícolas, en las que debido a la gran cantidad de animales que se alojan por cada caseta y al manejo en parvada

que se realiza, se dificulta en ciertas ocasiones el control de las infecciones que se presentan, así como su diagnóstico específico oportuno.

Las enfermedades o infecciones que se presentan en la producción avícola son muy variadas. Dentro de esta amplia gama ocurren infecciones capaces de persistir en el ave y en determinado momento manifestarse como parte de un complejo de coinfecciones. Dentro de los agentes infecciosos involucrados comúnmente como causa de enfermedades secundarias e inmunodepresoras en aves comerciales están los micoplasmas *Mycoplasma gallisepticum* (MG) y *Mycoplasma synoviae* (MS). Cuando ambos patógenos se presentan, en las

granjas inducen sustanciales pérdidas económicas por lo que son considerados de suma importancia para la industria avícola.

Estas bacterias afectan el tracto respiratorio produciendo aerosaculitis y cambios degenerativos en las mucosas, incluyendo la tráquea. La infección por MS en las articulaciones y los tendones causa problemas en las extremidades y mortalidad elevada en pollos y reproductoras. La severidad con que se presenta la infección por estos micoplasmas está influenciada por condiciones climáticas extremas, sobrepoblación y ventilación deficiente. Los casos en que se presenta aerosaculitis son más severos cuando las aves se infectan de manera conjunta con virus u otras bacterias.

Las pérdidas económicas asociadas con la presencia de Micoplasmosis incluyen, bajos niveles de producción de huevo, reducción de la viabilidad de las parvadas, pérdidas en la ganancia de peso, pobre conversión alimenticia, aumento en los costos por medicación y manejo. Otro factor económico difícil de medir concierne a las pérdidas adicionales inducidas por coinfecciones virales y / o bacterianas e inmunosupresión.

Los métodos diagnósticos mayormente empleados para identificar estos microorganismos son el aislamiento e identificación mediante pruebas bioquímicas, métodos serológicos y técnicas moleculares.

La base de los programas de monitoreo epidemiológico son las pruebas serológicas, donde comúnmente la prueba de aglutinación en placa es la más empleada, ya que es una prueba sencilla de fácil ejecución que se caracteriza por ser de alta sensibilidad y baja especificidad.

En la producción avícola existe la necesidad de análisis rápidos y confiables para detectar la infección por estos agentes infecciosos. Por un lado las pruebas bioquímicas y los cultivos tardan mucho tiempo, por lo que no son muy elegidos; sin embargo, los métodos serológicos ofrecen las ventajas de ser baratos, rápidos y significativamente veraces, siendo muy solicitados por esto, aunque sus resultados son cualitativos y solo ayudan para sugerir una exposición al agente etiológico, no diferenciando entre animales con infección latente o animales en recuperación.

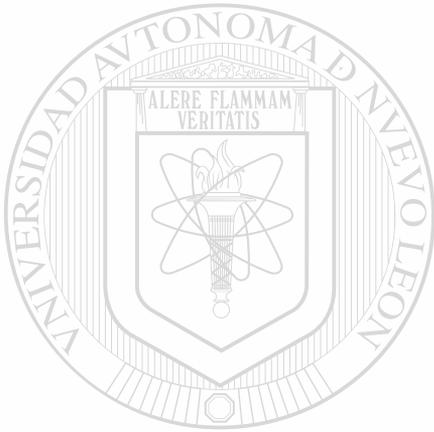
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Una de las técnicas nuevas y más sensibles que se han implementado como diagnóstico es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction ó PCR por sus siglas en inglés). Mediante esta técnica se generan millones de copias del ADN del agente patógeno a partir de una sola molécula de ADN de tal forma que revela la presencia o ausencia del material genético del microorganismo en la muestra del animal sospechoso.

El control sanitario de la infección por MG y MS es de vital importancia para mantener buenos índices productivos en el sector avícola. Los procedimientos recomendados para este control abarcan el establecimiento y

mantenimiento de parvadas libres de infección, adquiriendo solamente aves libres de micoplasmas, y el seguimiento puntual de un buen sistema de bioseguridad.

Por otra parte, la implementación de un diagnóstico preciso y oportuno de infección por micoplasmas nos permitirá implementar tratamientos específicos y en tiempos apropiados según sea la naturaleza del brote.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.1 Antecedentes

1.1.1 Historia

El primer cultivo exitoso de un micoplasma fue reportado por Nocard y Roux en 1898 al tratar de aislar al agente causante de pleuroneumonía bovina (Nocard y Roux, 1898). Nelson en los años 30's encontró *Mycoplasma spp.* en aves (Nelson, 1933, 1939) y el padecimiento recibió el nombre de "Enfermedad respiratoria crónica" (Delaplane y Stuart, 1943). Más tarde fue reportada la infección por *Mycoplasma synoviae* (MS) en pavos en 1905 (Dodd, 1905) que posteriormente en 1938 se nombró como "Sinusitis infecciosa" (Dickinson y Hinshaw, 1938).

Al principio de la década de los 50's, algunos investigadores como Markham, Wong, Van Roekel y Olesiuk reportan haber encontrado un microorganismo parecido al de la pleuroneumonía al observarlo en cultivos provenientes de muestras de pollos y pavos afectados, observando cierta similitud en los cultivos de las diferentes especies de aves, confirmando que se trataba de un micoplasma (Markham y Wong, 1952, Van Roekel y Olesiuk, 1953). Olson *et al.*, describieron por primera vez la sinovitis infecciosa y la asociaron con un micoplasma (Olson *et al.*, 1954).

Estudios realizados por Adler *et al.*, demostraron que los diversos aislamientos de micoplasmas representaban diferentes serotipos (Adler *et al.*,

1957). Posteriormente Yamamoto y Adler identificaron 5 serotipos (Yamamoto y Adler, 1958); Kleckner describió 8 serotipos, los cuales designó con letras de la A a la H (Kleckner, 1960). Otros investigadores como Yoder y Hofstad caracterizaron 12 serotipos (A-L) (Yoder y Hofstad, 1964), mientras que Dierks *et al.*, definieron 19 (A-S) (Dierks *et al.*, 1967).

El primer método para serotipificar a los micoplasmas se basó en la evaluación de diferentes títulos de aglutinación y en la inhibición de crecimiento por suero específico hiperinmune. De los 19 serotipos, algunos fueron integrados mientras que otros se excluyeron gracias al uso de nuevos métodos serológicos con los que fue posible definirlos en forma más precisa (Calnek, 1997).

Los aislamientos de diverso origen y los nuevos métodos diagnósticos serológicos y moleculares han permitido verificar el número de miembros del género *Mycoplasma* que infectan a aves comerciales, cambiando la designación inicial de serotipos por nombres de especies, las cuales son mostradas en la tabla I.

TABLA I ^(*)

ESPECIES DE MICOPLASMAS QUE INFECTAN POLLOS

ESPECIE	HOSPEDERO USUAL
<i>M. gallinaceum</i>	Pollos
<i>M. gallinarum</i>	Pollos
<i>M. gallisepticum</i> [⊕]	Pollos y pavos
<i>M. glycyphilum</i>	Pollos
<i>M. iners</i>	Pollos
<i>M. lipofaciens</i>	Pollos
<i>M. pullorum</i>	Pollos
<i>M. synoviae</i> [⊕]	Pollos y pavos

(*) Basada en Calnek, 1997.

⊕ De mayor importancia económica en pollo de engorda y gallinas ponedoras.

1.2.1 Etiología

Los micoplasmas son miembros de la clase *Mollicutes*; orden I,

Mycoplasmatales; género I, *Mycoplasma* en la que se incluyen 85 ó más especies,

contienen aproximadamente de 23-40% de G+C en el ADN, con un tamaño de genoma variable entre 600-1350 kb. Estos microorganismos requieren

colesterol para su crecimiento y afectan a humanos así como animales, son

células pleomórficas que varían en tamaño de 0.2 a 0.5 µm de diámetro y

básicamente adoptan formas cocoides o cocobacilares, aunque se han

observado formas de varillas delgadas, filamentosas y de anillo, carecen de

pared celular y están rodeados por una membrana celular solamente (Calnek,

1997, Razin y Freundt, 1984, Razin *et al.*, 1998). Más de 18 especies de

Mycoplasma han sido aislados y caracterizados a partir de diferentes tipos de

aves y de éstas, existen dos especies que son consideradas de importancia en

pollo de engorda y aves de postura, las cuales son *M. gallisepticum* (MG), que es causante de una enfermedad crónica respiratoria en pollos y *M. synoviae* (MS), que provoca enfermedad del tracto respiratorio superior y sinovitis (Fletcher *et al.*, 1976).

Cerca de 13 especies de micoplasmas pueden causar artritis en animales que en algunos casos ésta resulta ser crónica, por lo que particularmente la infección por MS es histológicamente parecida a la artritis reumatoide en humanos (Jansson *et al.*, 1983). Cuando la infección por MS se convierte en sistémica, origina sinovitis, una enfermedad infecciosa crónica en pollos que involucra primariamente a las membranas sinoviales de las articulaciones y cubiertas tendinosas, produciendo sinovitis exudativa, tendosinovitis o bursitis (Calnek, 1997).

Se han descrito diversos medios comúnmente usados para cultivar micoplasmas (Frey *et al.*, 1968). Para su crecimiento requieren un medio a base de proteína, al que se adiciona dextrosa, 10 a 15 % de suero ó factores del suero y extracto de levadura (Calnek, 1997, Yoder, 1975).

Para su crecimiento MS necesita la adición de dinucleótido de nicotinamida adenina, también conocido como NAD o Coenzima I (Yoder, 1975), el cual puede sustituirse por nicotinamida que es más barata (DaMassa y

Adler, 1975). Se ha reportado variación en los requerimientos de NAD en cepas de MS cultivadas *in vitro* (Yagihashi y Kato, 1984), el suero es esencial para su mantenimiento prefiriéndose el suero de cerdo (Chalquest, 1962), a diferencia de MG para el que se puede emplear suero de cerdo, caballo ó ave (Calnek, 1997).

Estos microorganismos tienden a crecer lentamente y usualmente a rangos de temperatura de 37-38°C, son resistentes al acetato de talio y a la penicilina, compuestos que son empleados para retardar el crecimiento de hongos y bacterias contaminantes. Las colonias en medios sólidos se observan de 3 a 10 días de incubación. La forma típica que se observa es de colonias pequeñas que varían entre 0.1 a 1.0 mm, lisas, circulares y planas con una elevación central más densa (Calnek, 1997), como puede observarse en la figura 1.



Figura 1. Fotografía de colonias de *Mycoplasma gallisepticum*. Morfología de colonias en medio de cultivo sólido. Imagen obtenida del Centro de Excelencia de Desarrollo de Vacunas, Universidad de Connecticut, USA. (<http://www.cevr.uconn.edu/mycgall.jpg>).

Las propiedades bioquímicas de ambos micoplasmas, aunque son muy similares, varían en algunas reacciones. Un resumen de éstas se presenta en la tabla II.

TABLA II
PRINCIPALES PROPIEDADES BIOQUÍMICAS DE MG Y MS^(*)

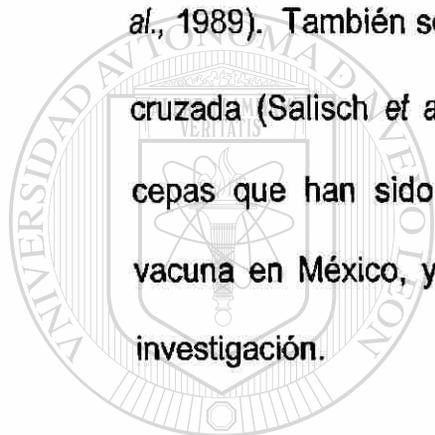
PROPIEDAD	MG	MS
Glucosa	+	+
Catalasa	-	-
Manosa	+	NCA
Maltosa	+	+
Lactosa	-	-
Ducitol	-	-
Salicina	-	NCA
Trehalosa	NCA	-
Fosfatasa	-	-
Producción de ácido sin gas	+	+
Hidrólisis arginina	-	-
Hemadsorción	+	d
Reducción de tetrazolium Ae/An	+/+	-
Hidrólisis gelatina	-	NCA
Digestión de suero coagulado	-	NCA
Digestión de caseína	-	NCA
Formación de película y manchas	-	+

+:Reacción positiva, -:Reacción negativa, d:11-89 % cepas son +, NCA: No conocida por el autor
(*) basada en Calnek, 1997 y Holt *et al.*, 1994.

Particularmente, se ha observado que el pH óptimo de crecimiento para MG es de 7.8 y para MS se ha encontrado que es sensible a pH menor o igual a 6.8. MG produce hemólisis de eritrocitos de caballo incorporados en agar y aglutina eritrocitos de pollo y pavo. De MG se han reportado cerca de 7 aislamientos (Calnek, 1997). Solo existe un serotipo de MS (Dierks *et al.*, 1967,

Olson *et al.*, 1964) y existen epítopes compartidos por MS y MG (Avakian y Kleven, 1990).

Existe evidencia de reacción cruzada entre MG y MS mediante estudios de hibridación en cuyos resultados se observa que comparten secuencias de nucleótidos adicionales a los genes conservados de ARN ribosomal (Yogev *et al.*, 1989). También se ha reportado que entre MG y *M. immitans* existe reacción cruzada (Salisch *et al.*, 2000, Calnek, 1997). En la tabla III se muestran las cepas que han sido empleados como antígenos para aglutinación y como vacuna en México, y además se han incluido como controles en la presente investigación.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

TABLA III
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
CEPAS EMPLEADAS EN NUEVO LEÓN PARA CONTROL DE MG Y MS

ESPECIE	CEPA	TIPO	REFERENCIA
<i>M. gallisepticum</i>	S6	Antígeno aglutinación	Adler 1968
	ts-11	Cepa vacunal	Whithear 1990
<i>M. synoviae</i>	WVU-1853	Antígeno aglutinación	Olson 1963
	MS-H	Cepa vacunal	Morrow 1998

1.2 Epizootiología

1.2.1 Distribución geográfica

La infección por MS sucede a menudo en ponedoras comerciales con edades múltiples y su distribución es mundial (Mohamed *et al.*, 1986, Opitz 1983). La sinovitis infecciosa se observó por primera en aves en crecimiento de 4 a 12 semanas de edad en EE.UU. durante el período de 1950-1960. Durante los decenios siguientes, 1970-1980, la forma de sinovitis se reportó pocas veces en pollos, pero el tipo respiratorio se presentó en éstos con mayor frecuencia, siendo común la infección sin signos clínicos (Calnek, 1997).

En el caso de MG, se ha reportado una disminución en su incidencia debido a los extensivos programas de control en la industria avícola, sin embargo la continua infección con MG en ponedoras comerciales es un gran problema (Calnek, 1997), existiendo también evidencia que MG está presente en aves de traspatio (Mc Bride *et al.*, 1991).

1.2.2 Especies afectadas

MG y MS se presentan de forma natural en pollos y pavos (Calnek, 1997); además de los animales anteriores, las aves de Guinea son hospederos naturales de MS (Pascucci *et al.*, 1976). Los patos (Bencina *et al.*, 1988a), gansos (Bencina *et al.*, 1988b), palomas, codorniz japonesa (Bencina *et al.*,

1987) y perdices patas rojas (Poveda *et al.*, 1990) son susceptibles de infectarse de forma natural con MS.

MG ha sido aislado en infecciones naturales de faisanes, perdices, pavo real, codorniz cola blanda y codorniz japonesa (Calnek 1997). Asimismo de loros (Bozeman *et al.*, 1984), patos (Jordan y Amin, 1980) y gansos (Brown *et al.*, 1991). Faisanes, patos (Yamada y Matsuo, 1983), gansos y pericos son susceptibles a MS por inoculación. Los gorriones caseros también se infectan por infección artificial de MS, aunque son muy resistentes (Kleven y Fletcher, 1983).

1.2.3 Transmisión

La transmisión lateral se presenta fácilmente por contacto directo para MS y MG (Calnek, 1997). Sin embargo la diseminación de MS es más rápida (Olson y Kerr, 1967), aunque se ha estudiado una cepa de baja transmisibilidad (Weinack *et al.*, 1983). La ruta de entrada para ambos (MS y MG), es por vía respiratoria. También existe transmisión vertical para los dos micoplasmas y ésta es importante ya que provoca pérdidas en la producción de huevo. MG fue aislado de oviductos de aves infectadas y de semen de gallos que presentaron la enfermedad (Yoder y Hofstad, 1964). Los pavos son sensibles a la inoculación intrasinusal de MS y la infección por este microorganismo muestra sinergismo con *Mycoplasma meleagridis* (Rhoades, 1977).

La diseminación lateral de MG ha sido descrita en 4 fases: 1) fase latente, de 12-21 días antes de detectar anticuerpos; 2) fase en la que aparece un 5-10% de animales infectados en una población, dura cerca de 1-21 días; 3) fase tres, que dura aproximadamente 7-32 días en la cual, el 90-95% de la población restante desarrollan anticuerpos; y la fase 4) fase terminal, que dura de 3 a 19 días en la cual la población restante resulta positiva (Mc Martin *et al.*, 1987). La sinovitis infecciosa ha sido observada en pollos de 6 semanas de edad, lo que sugiere que el período de incubación es más corto en las aves infectadas por transmisión vertical. En aves de 3-6 semanas experimentalmente infectadas con MS por inoculación de exudado articular de aves con la enfermedad o yema de embriones infectados se han encontrado los siguientes períodos de incubación, dependiendo de la vía de entrada: por almohadilla plantar 2-10 días; intravenosa, 7-10 días; intraperitoneal, 7-14 días; intrasinusal, 14-20 días; y por instilación conjuntival, 20 días. La infección en tráquea y senos nasales puede darse cerca de 4 días después de la inoculación intratráqueal, el período de incubación después de la exposición por contacto es mayormente de 11 a 21 días, pero varía dependiendo de la exposición de las aves al agente y la patogenicidad de la cepa (Calnek, 1997). Las lesiones en sacos aéreos aparecen entre los 17-21 días después del desafío aerosol (Kleven *et al.*, 1972).

En un estudio en el que 50 pollos libres de micoplasmas se colocaron en contacto con 5 pollos infectados experimentalmente con tres diferentes cepas

de MS (dos cepas de campo y una de laboratorio), se encontró que estas aves resultaron positivas a los 3 días post-inoculación, realizando la detección del agente por medio de cultivos y PCR (Ewing *et al.*, 1998). Por otra parte, para MG se ha reportado un período de incubación de entre 6 a 21 días en transmisión experimental. Sin embargo bajo condiciones naturales es muy difícil determinar la fecha exacta de exposición, debido a que existen muchos factores involucrados, la morbilidad para sinovitis clínica por MS varía de 2-5%, usualmente iniciando con 5-15%. En caso de la afección respiratoria, su morbilidad es de 90 a 100 %. La mortalidad es menor a 1%, aunque puede llegar hasta 10%, siendo común que se complique con virus respiratorios y *E. coli* (Calnek, 1997). Se ha reportado el efecto de las bajas temperaturas con la severidad de las lesiones causadas por MS (Yoder *et al.*, 1977).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Para MG, la infección sucede usualmente en el 100% de la parvada, pero es variable en severidad y duración, siendo más frecuente y de mayor duración en climas fríos y afecta más severamente a los animales jóvenes que a los adultos, además de ocasionar considerables pérdidas por la disminución de producción de huevo (Calnek, 1997). En pollo de engorda la mortalidad puede permanecer en rangos más bajos que en las infecciones complicadas donde alcanza 30%.

1.2.4 Signos Clínicos

Los signos más característicos de la infección por MG en parvadas adultas son estertores traqueales, descarga nasal y tos. El consumo de alimento se reduce y las aves pierden peso, siendo la infección más severa durante el invierno y más común en parvadas jóvenes que en adultas (Calnek, 1997). Se ha reportado que en parvadas de ponedoras la producción de huevo declina y usualmente se mantiene a niveles bajos (Mohammed *et al.*, 1987). También se han reportado signos de queratoconjuntivitis en ponedoras comerciales (Nunoya, *et al.*, 1995). En caso de MS, los primeros signos observados en las parvadas afectadas son palidez de la cresta, claudicación y retraso en el crecimiento, conforme el progreso de la enfermedad las plumas se observan erizadas y la cresta reducida en tamaño, también se presenta inflamación alrededor de las articulaciones y en el cojinete plantar, siendo las articulaciones tibiotarsianas las más afectadas; se han presentado lesiones papulares en el pecho debido a que los animales permanecen postrados y en ocasiones se encuentran aves con infección generalizada pero no con inflamación articular, manifestando signos de indiferencia, deshidratación y emaciación, esto sin que el ave presente anorexia; también puede haber manifestaciones clínicas en las heces, observándose éstas de color verdoso conteniendo gran cantidad de uratos, siendo estos signos seguidos de una recuperación lenta y a que la sinovitis puede persistir toda la vida haciéndose crónica. Algunas aves infectadas por vía respiratoria pueden presentar

estertores, siendo también en invierno cuando se presentan más lesiones en sacos aéreos (Calnek, 1997). Cuando la infección natural por MS ocurre en parvadas adultas, el efecto en la producción y calidad del huevo es poco o nulo (Mohammed *et al.*, 1987, Opitz, 1983). Entre los cambios sistémicos ocasionados por micoplasmas se incluyen anemia, reticulitis, arteritis, atrofia del timo y de la bolsa de fabricio (Jordan, 1981).

1.2.5 Patogenia

Muchos aislamientos de MS pueden ocasionar una enfermedad ligera o subclínica (Calnek, 1997). Recientemente ha sido reportado el aislamiento de un microorganismo muy virulento llamado K1968, el cual invade sistémicamente al organismo y produce una lesión severa al inocularlo en el ojo (Lockaby *et al.*, 1999b). Igualmente se ha logrado el aislamiento de una cepa llamada WVU 1853 que resultó ser de alta letalidad en embriones de pollo (Lockaby *et al.*, 1999a). Los MS aislados de lesiones de sacos aéreos provocan la mayoría de las veces aerosaculitis, mientras los aislamientos a partir de líquido sinovial producen principalmente sinovitis (Kleven *et al.*, 1975). La aerosaculitis es exacerbada por vacunación contra la enfermedad de Newcastle (NC) y Bronquitis Infecciosa (BI) (Kleven *et al.*, 1972) o alguna otra infección respiratoria. Se ha reportado que la severidad de la aerosaculitis puede depender de la virulencia de virus de BI usados en conjunto con MS (Hopkins y Yoder, 1982), así como la vacunación con cepas virulentas de Enfermedad de

Marek disminuye la respuesta de anticuerpos contra MS y causa severas lesiones en la bolsa de fabricio (Ellis *et al.*, 1981). En estudios de investigación sobre la patogénesis de aerosaculitis micoplásmica en pavos, se produjeron lesiones exudativas por la inoculación de membranas celulares u organismos viables de MS (Rhoades, 1987).

En cuanto a MG, la patogenicidad de los microorganismos varía dependiendo de la naturaleza del aislamiento, el método de propagación, el número de pasajes que ha sufrido y la dosis (Calnek, 1997). Se ha encontrado que los linfocitos bursa-dependientes se correlacionan con la resistencia a desarrollar lesiones (Kume *et al.*, 1977) y los linfocitos timo-dependientes son necesarios para desarrollar lesiones macroscópicas (Kume *et al.*, 1977, 1979).

1.2.5.1 Lesiones macroscópicas

En las primeras etapas de sinovitis infecciosa, las aves presentan exudado gris a cremoso que afecta a las membranas sinoviales de las cubiertas tendinosas, articulaciones y bolsa del esternón. También se ha encontrado hepatoesplenomegalia. Los riñones presentan inflamación, además de una coloración pálida, en ocasiones de aspecto moteado. Conforme progresa la enfermedad, se puede encontrar exudado caseoso que afecta a las cubiertas tendinosas y articulaciones extendiéndose a los músculos y sacos aéreos. Las superficies articulares de las regiones tibiotarsiana y escapulohumeral, se

adelgazan con el tiempo. Generalmente no se observan lesiones macroscópicas en el tracto respiratorio superior, sin embargo, en la forma respiratoria de la enfermedad se observa aerosaculitis (Calnek , 1997).

Experimentalmente se ha encontrado que MS y MG causan artritis, tendosinovitis y lesiones al tejido peri-articular, siendo las articulaciones más afectadas con estos signos la tibiotarsal-tarsometatarsal y la tarsometatarso-falángica (Jordan, 1981). Las lesiones ocasionadas por MG de forma inicial consisten en exudado catarral en senos nasales y paranasales, tráquea, bronquios y sacos aéreos; sinusitis en pollos y hospederos aviares. Se pueden observar diversos grados de neumonía y en casos severos de enfermedad típica de sacos aéreos, se observa perihepatitis y pericarditis fibrinosa o fibrinopurulenta con aerosaculitis masiva (Calnek, 1997). También se han observado lesiones de salpingitis (Domermuth *et al.*, 1967) y queratoconjuntivitis en aves (Nunoya, *et al.*, 1995).

1.2.5.2 Lesiones microscópicas

Entre las lesiones causadas por MG se observa marcado engrosamiento de la membrana mucosa de los tejidos afectados, ya sea por o con infiltración de células mononucleares e hiperplasia de las glándulas mucosas (Van Roekel *et al.*, 1957). En los pulmones se han encontrado áreas neumónicas, cambios linfo-foliculares y lesiones granulomatosas. (Calnek, 1997). También se han

reportado casos de encefalitis por MG en los cuales los cambios histopatológicos revelaron severa encefalitis con vasculitis fibrinoide, necrosis focal parénquimal y meningitis (Chin *et al.*, 1991). Por otra parte, en los casos de conjuntivitis asociado a MG se observa hiperplasia epitelial, severa infiltración celular y edema del tejido conectivo fibrovascular subepitelial y central del estroma, el cual resulta en engrosamiento de los párpados (Nunoya *et al.*, 1995).

Particularmente en las articulaciones del pie y corvejón muestran infiltrado de heterófilos y fibrina en los espacios articulares y alrededor de las vainas tendinosas, encontrándose también, las superficies del cartílago decoloradas, adelgazadas o con perforaciones (Calnek, 1997). Se han reportado lesiones en sacos aéreos que varían en severidad, encontrándose así, edema, proliferación capilar, exudado de consistencia mayor de heterófilos y restos necróticos, marcada hiperplasia de células epiteliales e infiltración difusa de células mononucleares en el tejido conectivo de sacos aéreos (Fletcher *et al.*, 1976). En las articulaciones se han observado cambios histopatológicos en los que se observa invasión con heterófilos (Kume *et al.*, 1977, Jordan, 1981) y después monocitos. Se ha registrado la formación de *Villus* por el sinovium y aparecen agregados linfocitarios. En casos severos hay erosión progresiva del cartílago articular y cambios degenerativos en los huesos (Jordan, 1981).

MS puede alojarse en el citoplasma de células adiposas, se observan fibroblastos alargados en las cubiertas tendinosas debido a la acumulación de

inclusiones de lípidos citoplásmicos y además se presenta pérdida de tejido conectivo. Las células del tejido sinovial proliferan y contienen cantidades incrementadas de retículo endoplásmico granular e inclusiones lipídicas (Walker *et al.*, 1978).

Se ha descrito la patología cardíaca (Kerr, 1967), así como el efecto de hiperplasia del sistema monocito-macrófago causado por MS (Calnek, 1997).

En estudios recientes se han reportado alteraciones inducidas en eritrocitos de pollo causadas por MG (Lam, 2003).

1.2.6 Diagnóstico

El diagnóstico concluyente para ambos micoplasmas es el aislamiento e identificación del agente etiológico mediante cultivo, siendo más fácil el aislamiento a partir de aves con infección aguda que de las infectadas de forma crónica (Calnek, 1997). Para MG se pueden obtener muestras en suspensión de exudado tráqueal, sacos aéreos, coanas y pulmones, inoculando en medio líquido o agar (Kleven y Yoder, 1989). Se ha reportado el medio de Frey's para cultivar MG (Frey, *et al.*, 1968), el cual también funciona para MS haciendo algunas modificaciones. Este agente, MG, ha sido aislado de tejidos de tracto respiratorio superior de pavos expuestos a organismos vivos (Rhoades, 1987), así como de muestras de medioambiente de granjas infectadas experimentalmente, entre las que se incluyen muestras de alimento, agua de

bebida, plumas, gotas o polvo (Marois *et al.*, 2000) A veces resulta difícil el aislamiento de MS, ya que aún en muestras positivas por serología mediante inhibición de hemoaglutinación, ELISA y aglutinación en placa, no se ha podido realizar el aislamiento (Avakian *et al.*, 1992).

Existen también pruebas serológicas de las cuales la más comúnmente empleada para detectar es la prueba de aglutinación en placa, la cual emplea un antígeno coloreado en suspensión, el cual esta disponible comercialmente para MG y MS. Se requieren cerca de 2-4 semanas para desarrollar anticuerpos en aves infectadas (Olson *et al.*, 1963).

Mediante aglutinación en tubo se ha demostrado la presencia de anticuerpos en suero de pavos que fueron inoculados con membranas y organismos completos de micoplasma (Rhoades, 1987). Algunos aislamientos de MS pueden aglutinar eritrocitos de pollo y pavo (Calnek, 1997). Desde el año de 1976 se encontró evidencia de una aglutinina en suero de pájaros infectados crónicamente con MS, la cual aglutina eritrocitos de pollo, gato, perro, pollos y cerdos de guinea, pero no eritrocitos de bovino ni de ovino (Sahu y Olson, 1976).

Las pruebas de ELISA son comúnmente empleadas para realizar monitoreos en parvadas y reemplazan a las pruebas de aglutinación, existiendo comercialmente diversos estuches (Higgins y Whithear, 1986, Patten *et al.*,

1984). A su vez, se han desarrollado pruebas para detectar anticuerpos en secreciones respiratorias, fluido sinovial, glándula harderiana, oviducto y yema (Bencina y Bradbury, 1991)

También se han desarrollado pruebas de inmunoblot para MG y MS que pueden ser útiles para un rápido, sencillo y específico diagnóstico de micoplasmosis aviar (Shimizu *et al.*, 1990). La técnica de Inmunoblot se empleó en un estudio para detectar si existe reacción cruzada de MS con *Acholeplasma laidlawii* y otras especies de micoplasmas, resultando que los patrones observados para MS fueron característicos solo para este agente (Avakian *et al.*, 1992).

La tinción directa de micoplasmas en superficies de agar o improntas con anticuerpos fluorescentes específicos ha sido utilizada para determinar la especie en los aislamientos (Talkington y Kleven, 1983). Otros métodos disponibles son la inhibición de crecimiento (Clyde, 1964) y la inmunodifusión (Nonomura y Yoder, 1977).

Actualmente, se han desarrollado nuevas pruebas diagnósticas basadas en la detección de ácidos nucleicos, como el análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP's) que han sido empleado para diferenciar cepas de MG (Kleven *et al.*, 1988), al igual que el análisis de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (Charlton *et al.*, 1999), siendo ambos

métodos muy útiles para diferenciar entre cepas de MG vacunales y de campo (Khan y Yamamoto, 1989).

En resumen existen numerosas pruebas moleculares para detectar micoplasmas tales como secuenciación del gen de ARNr (Grau *et al.*, 1991), pruebas de DNA (Hyman *et al.*, 1989, Khan y Kleven, 1993, Fernández *et al.*, 1993), PCR (Silveira *et al.*, 1996.), PCR múltiple (Pang *et al.*, 2002), PCR tiempo real (Carli y Eyigor, 2003) y también pruebas de PCR que amplifican el gen de ARNr seguido de corte con enzimas de restricción (Fan *et al.*, 1995, García *et al.*, 1995).

Se han reportado pruebas de PCR específicas para MG (Slavik *et al.*, 1993) y para MS (Zhao y Yamamoto, 1993). En la última década, para MS también se han realizado diversas pruebas enzimáticas con nucleótidos unidos a fosfatasa alcalina (SNAP) (Salisch *et al.*, 2000) y pruebas para diferenciación de cepas de MS por medio de RAPD (Marois *et al.*, 2001).

Se ha detectado MS por método de PCR en una variedad de muestras tomadas a partir del ambiente físico de la granja, como son jaulas, madera, alimento etc. (Marois *et al.*, 2000), mostrando la capacidad del microorganismo de sobrevivir bajo condiciones naturales.

También existen estuches comerciales para la detección de MG y MS por método de PCR, los cuales se encuentran disponibles en México.

En investigaciones anteriores, se ha concluido que el uso de pruebas de ADN son muy indicativas de la infección, su desarrollo puede reemplazar laboriosas técnicas de cultivo y son más efectivas que los métodos serológicos, por lo que reducen el tiempo requerido para el diagnóstico (Hyman *et al.*, 1989).

Actualmente con la secuenciación completa de cepas de *Mycoplasma* el desarrollo y aplicación de pruebas moleculares será de mayor importancia y especificidad (Papazisi *et al.*, 2003).

1.2.7 Tratamiento

Considerando que los micoplasmas carecen de pared celular, los antibióticos empleados para su control son los que inhiben la síntesis de proteínas y de ADN. En la tabla IV se muestran los antibióticos a los que son susceptibles MG y MS.

Recientemente se han revelado datos sobre la resistencia *in vitro* de MG y MS a algunos agentes como eritromicina y tilosina para los cuales ambos micoplasmas resultaron altamente resistentes. Para la enrofloxacin, los micoplasmas también desarrollan resistencia, aunque esta es gradual. La

tiamulina y oxitetraciclina son una buena opción para tratamiento, ya que no se ha encontrado evidencia del desarrollo de resistencia a estos fármacos (Gautier-Bouchardon *et al.*, 2002).

TABLA IV

SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS DE MG Y MS

ANTIBIÓTICO	ESPECIE	
	MG	MS
Estreptomina	+/	NCA
Oxitetraciclina	+	+
Clortetraciclina	+	+
Eritromicina	+/	-
Espiramicina	+/	+
Tilosina	+/	+
Lincomicina	+	+
Espectinomicina	+	+
Magnamicina	+	NCA
Danofloxacina	+	+
Enrofloxacin	NCA	+
Tiamulina	*	+
Tiamulina- Salinomina plus	*	NCA

+ : Susceptible, / : Aislamientos con grado de resistencia, - : resistente, * : Efectivo como tratamiento en pollos y pavos, NCA : No conocido por el autor
 Basada en Cummings *et al.*, 1986, Timms *et al.*, 1989, Calnek, 1997, Arzey y Arzey, 1992 y Whithear *et al.*, 1983.

Yoder reportó un método para romper el ciclo de transmisión a través del huevo (Yoder, 1970). También se ha usado sumergir los huevos en soluciones con antibiótico y esto ha dado buenos resultados en Estados Unidos, gracias a los cuales se ha logrado mantener progenies de parvadas libres de MG y MS (Calnek, 1997).

1.2.8 Prevención y control

Para mantener las parvadas libres de infección por MG y MS las granjas deben aislarse del contacto con fuentes de infección intensificando las medidas de bioseguridad, así como, deben considerar que las aves de reemplazo solo deben provenir de parvadas libres de MG y MS.

Para prevenir la infección por ambos micoplasmas existen en el mercado bacterinas muertas y vivas de diferentes laboratorios. Algunos investigadores reportan que las bacterinas inactivadas de MG pueden proteger a pollo de engorda de aerosaculitis (Karaca y Lam, 1987) y a ponedoras de la reducción de postura (Yoder y Hopkins, 1985), pero otros no han detectado mucha eficacia (Khan *et al.*, 1986). La bacterina en forma inactivada se considera más segura que la forma viva, sin embargo tienen la desventaja de tener alto costo y la necesidad de tener que aplicarse individualmente (Levinson y Kleven, 2000). Por otra parte, las primeras vacunaciones con bacterina viva de MG emplearon la cepa F y fueron reportadas por Van Der Heide y Carpenter (Calnek, 1997). Sin embargo, en 1982 se encontró que la cepa F era patogénica en pavos (Lin y Kleven, 1982a) y además se asoció con brotes de campo en líneas reproductoras de pavos y también de producción de carne (Ley *et al.*, 1993). Existen reportes que la transmisión al huevo de la cepa F no ocurre por inoculación de ésta vía ocular en gallinas, pero si ocurre cuando la vacunación es en aerosol (Calnek, 1997). Sin embargo, la transmisión al huevo

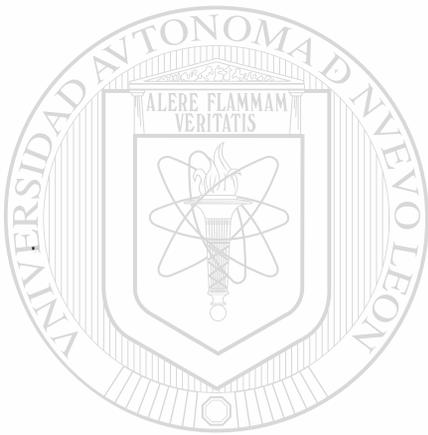
fue más alta cuando se emplea vacuna viva cepa R administrada por ambas vías (Lin y Kleven, 1982b).

Actualmente, las vacunas vivas de MG emplean las cepas 6/85 y ts-11, las cuales poseen poca o nula virulencia en pollos y pavos. La vacuna con cepa 6/85 se administra en aerosol, no induce respuesta inmune y puede detectarse en tracto respiratorio 4 a 8 semanas después de vacunación (Evans y Hafez, 1992). La vacuna con cepa ts-11 es avirulenta, de baja diseminación horizontal, desarrolla niveles bajos de anticuerpos circulantes, persiste en tracto respiratorio alto durante la vida de la parvada e induce protección al desafío con MG (Whithear, 1996). También existe una reciente vacuna contra MS, la cual corresponde a una cepa mutante desarrollada en Australia denominada MS-H que fue clonada a partir de una cepa de campo y ofrece las cualidades de ser termoestable, avirulenta, proporcionar inmunización desde la tercer semana después de la vacunación y no ocasionar lesiones significativas en aves (Markham *et al.*, 1998).

Durante el 2002 se estudio una vacuna viva modificada de MG llamada GT5 la cual provocó el desarrollo de protección en pollos que fueron desafiados con inoculación de una cepa R virulenta de bajo pasaje, no encontrando evidencia de lesiones traqueales a las 2 y 4 semanas después del desafío. (Papazisi *et al.*, 2002).

1.3 Hipótesis

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa acoplada a los análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de sitio de corte son apropiadas como herramientas diagnósticas para detectar y diferenciar las infecciones por *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* en aves de producción.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

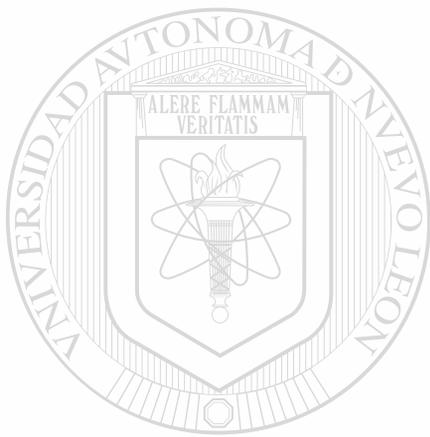
Implementar el diagnóstico molecular basado en la combinación de las técnicas de PCR y RFLP para detectar y diferenciar dos especies patógenas de micoplasmas para aves.

1.4.2 Objetivos Particulares

1. Adaptar y aplicar un protocolo de diagnóstico simple basado en PCR-RFLP.
2. Aplicar el procedimiento PCR-RFLP para la detección e identificación molecular de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* a partir de muestras clínicas.
3. Comparar la eficacia de este método con el diagnóstico serológico de la infección.

1.5 Metas

Establecer la técnica de diagnóstico molecular PCR-RFLP para la detección de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* y plantearla como prueba de diagnóstico confirmatorio para estas infecciones a los avicultores de la región Noreste de México.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



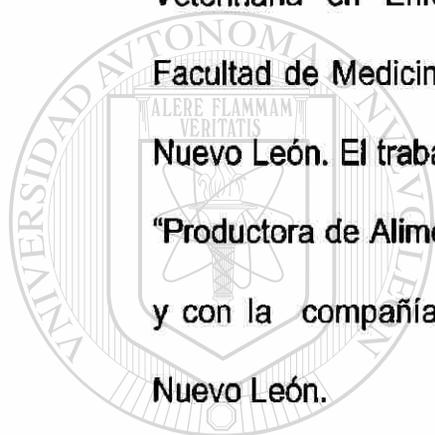
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Lugar de realización de la investigación

La presente investigación se realizó en la Unidad de Investigación Veterinaria en Enfermedades Infecciosas y Genética (UnIVEIGen) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León. El trabajo de campo fue realizado en colaboración con la empresa "Productora de Alimentos Pecuarios S.A." (PAPSA) ubicada en Salinas Victoria y con la compañía "Comercializadora de huevos" del municipio de Allende, Nuevo León.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.2 Procedencia de las muestras

En este estudio se incluyeron dos tipos de muestras, en primer lugar las muestras empleadas como control, las cuales sirvieron para confirmar el poder de detección de la prueba y en segundo lugar, las muestras clínicas, las cuales se obtuvieron a partir de aves comerciales. Las muestras control consistieron en antígeno para aglutinación en placa y vacunas comercialmente disponibles. Por otro lado, las muestras clínicas provinieron de pollos de engorda, gallinas ponedoras y a ves reproductoras localizadas en granjas del estado de Nuevo

León y Coahuila, particularmente de los municipios de Allende, N.L. y de Saltillo, Coahuila. Las muestras fueron seleccionadas en base a un diagnóstico previo ó sospecha de infección por micoplasmas. El origen individual de las muestras se muestra en la tabla V.

TABLA V

PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS Y TIPO DE MUESTREO

No. DE MUESTRAS	FUNCIÓN ZOOTECNICA DEL AVE	EDAD (SEMANAS)	VAC		TIPO DE MUESTRA	PROCEDENCIA
			MG	MS		
10	Pollo engorda	6	-	-	Grupos de 3 hisopos en medio ICC*	Saltillo Coah
10	Ponedoras	3	-	-	Lavado tráqueal	Allende N.L
10	Ponedoras	28	-	-	Lavado tráqueal	Allende N.L.
17	Reproductoras	38	+	+	Grupos de 3 hisopos en medio ICC	Saltillo Coah
10	Reproductoras	38	-	-	Grupos de 3 hisopos en medio ICC	Saltillo Coah

*ICC: Infusión cerebro y corazón (Merk KgaH 64271 Darmstad Germany).

2.3 Obtención de las muestras

2.3.1 Obtención de muestras empleadas como controles

Las muestras empleadas como controles se obtuvieron a partir de 2 productos comerciales: el primero a partir del antígeno para aglutinación en placa para MG y MS cuyo nombre es **Nobilis MG Antigen y Nobilis MS Antigen** respectivamente, de la compañía INTERVET International B.V. (Wim de Korverstraat 35 P.O. Box 31 5830 AA Boxmer Holanda). Este producto contiene una suspensión de micoplasmas coloreados con cristal violeta. El segundo, se obtuvo a partir de las vacunas vivas para MG conteniendo la cepa ts-11 de la marca Merial Select Inc. (Gainesville, GA 30503 USA) con número de lote MA339 y MS Vax-safe de Avi-mex S.A. de C.V (Maíz 18 México 09810 D.F.) con la cepa MS-H y número de lote 140502.

2.3.2 Obtención de muestras clínicas

Las muestras clínicas a partir de aves para el PCR-RFLP fueron obtenidas de dos formas:

- 1) Exudados traqueales: obtenidos mediante el frotado de hisopos de algodón estériles sobre la mucosa /exudado de la tráquea de cada ave. Un grupo de 3 hisopos independientes, procedentes de igual cantidad de aves y mismo lote, fueron colocados en tubos de ensayo (18 X 50) con 5 ml de medio de

transporte (caldo de infusión cerebro-corazón) hasta su uso.
Ver apéndice B para la preparación del medio.

- 2) Lavados traqueales: efectuados con 1 ml de PBS estéril aplicado directamente sobre la mucosa tráqueal con jeringa estéril y depositado finalmente en tubos de plástico estéril de 1.5 ml (Ver apéndice 1 para materiales).

A partir de los exudados y lavados traqueales se colectó 1 ml de muestra en glicerol al 20% a -40°C para su posterior cultivo.

2.4 Obtención de ácido desoxirribonucleico (ADN)

2.4.1 Obtención de ADN a partir de antígenos y vacunas comerciales

La técnica de extracción de ADN, a partir de células de micoplasma (MG y MS) empleadas como antígeno en la prueba de aglutinación en placa, fue realizada mediante lavados con PBS 150mM [pH 7.2]. En breve, fueron centrifugados 0.5 ml de suspensión de antígeno a 3,000 rpm durante 5 minutos, luego se vació el sobrenadante y el sedimento obtenido fue lavado con 500 μl de PBS 150mM y posteriormente se agitó hasta su homogenización. Consecutivamente se volvió a centrifugar y lavar bajo las mismas condiciones. Luego de éste segundo lavado, el sedimento fue resuspendido en 100 μl de

H₂O UPE y calentado a 95°C durante 10 minutos. Después cada tubo fue centrifugado durante 2 minutos a 14,000 rpm. El sobrenadante fue utilizado inmediatamente en el PCR para evitar la degradación del ADN.

Esta misma técnica se empleó para la extracción de ADN de la vacuna comercial, modificando solamente el volumen centrifugado a 1ml. Los lavados con PBS se realizaron con 500 µl y al final el sedimento se resuspendió en 50 µl de H₂O UPE para posteriormente calentar a 95°C y extraer el sobrenadante.

Para estimar la cantidad de ADN aislado, los productos de estas extracciones fueron analizadas en un gel de agarosa al 0.8%. Las condiciones de separación consistieron en el uso de amortiguador TBE 1X bajo una corriente eléctrica de 75 volts durante 30 minutos en una cámara de electroforesis horizontal. La tinción fue realizada con solución de BE al 0.1% durante 10 min. La visualización del ADN fue llevada a cabo bajo luz ultravioleta (rango 265-290).

Para la consulta de los materiales empleados sobre extracción de ADN, referirse al apéndice A.

2.4.2 Obtención de ADN a partir de muestras clínicas

La extracción de ADN, tanto de las muestras de exudado traqueal como de los lavados traqueales, fue ejecutada como previamente se describió en el punto anterior. En breve, 2 ml de medio ICC fueron centrifugados a 14,000 rpm por 10 minutos. El sedimento fue lavado 2 veces con 200µl de PBS y posteriormente fue resuspendido en un volumen final de 20µl de H₂O UPE. La

suspensión fue calentada a 95°C durante 10 minutos y posteriormente centrifugada a 14,000 rpm durante 5 minutos. Subsecuentemente se obtuvo el sobrenadante, que es la parte donde está suspendido el ADN y fue empleado de inmediato en la reacción de PCR ó fue congelado a -20°C hasta su posterior uso.

2.5 Protocolo para PCR-RFLP

2.5.1 Dilución de los iniciadores

Los iniciadores empleados para la reacción de PCR fueron nombrados MYC1 y MYC2, cuyas secuencias son: MYC1 5'-AGGCAGCAGTAGGGAAT-3' y MYC2 5'-GTCTCGTTAGATAAAGT-3' (García *et al.*, 1995). Éstos fueron sintetizados por la compañía BIO-TEK y originalmente se suministraron en forma liofilizada a una concentración de 233 µg para MYC1 y 329 µg para MYC2. Ambos fueron diluidos con H₂O UPE hasta dejarlos a una concentración de 100pmol/µl. Estos iniciadores amplifican un fragmento de 780pb del gen semi-conservado 16S RNA ribosomal. Este gen esta compuesto de regiones altamente conservadas en todos los procariotas y de regiones con diversos grados de variación. La importancia en la elección de los iniciadores para la amplificación de esta región ya ha sido discutida por García y col. (García *et al.*, 1995).

2.5.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa

Los experimentos realizados para la implementación de la técnica de PCR permitieron determinar las condiciones adecuadas para una óptima amplificación. Fue determinante la modificación de la concentración del magnesio, ya que alteraciones en su concentración contribuye a la formación de productos de amplificación inespecíficos (exceso) o la deficiente amplificación (escaso). Los demás ingredientes tales como el buffer 10X, la Taq polimerasa, los DNTP's y los iniciadores se usaron a la misma concentración, al igual que se emplearon las mismas cantidades de ADN basados en García *et al.*, 1995. Las condiciones del PCR implementado, así como el programa para amplificación se presentan en las tablas VI y VII. También se realizó una disminución de los ingredientes de la mezcla a la mitad para reacciones de 50µl, cuyas imágenes se presentan en la sección de resultados.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA VI
INGREDIENTES DE LA MEZCLA DE PCR^(*)

INGREDIENTE	CONCENTRADO	VOLUMEN AÑADIDO	CONCENTRACIÓN FINAL
Iniciador MYC1	940pmol	4.25 µl	20pmol
Iniciador MYC2	955pmol	4.20 µl	20pmol
MgCl ₂	50mM	3.00 µl	1.5mM
Buffer 10X sin MgCl ₂	10X	10.00 µl	1X
DNTP's	10mM c/u	2.00 µl	200µM
H2O UPE	-----	75.05 ó 73.05 µl	-----
Taq polimerasa	5u/µl	0.50 µl	2.5u
ADN Molde	-----	1.00 ó 3.00 µl	ND
Volumen final		100.00 µl	

(*) García et al., 1995, con ligeras modificaciones.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
TABLA VII
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

PROGRAMA PARA TERMOCICLADOR

	FASE	TIEMPO	TEMPERATURA
35 ciclos	Desnaturalización	5 min	94°C
	Desnaturalización	1 min	94°C
	Extensión	1 min	45°C
	Apareamiento	1 min	74°C
	Extensión final	5 min	74°C

2.5.3 Visualización de productos amplificados

Los productos amplificados fueron visualizados en gel de agarosa al 2%. La agarosa fue pesada y diluida con TBE 1X y posteriormente fundida en un horno de microondas. Una vez fundida se vació en un molde y se le colocó un “peine” para formar los pozos de separación hasta su solidificación. Se retiró el peine y se colocó en la cámara de electroforesis horizontal que contenía amortiguador TBE1X. Por otra parte, en una mica de “parafilm” se mezclan a razón de 1:4, 1µl de amortiguador de carga por cada 4µl de producto de PCR de cada muestra a analizar para después colocarlas en el pocillo correspondiente. El programa de electroforesis empleado consistió en corrimiento a 100 voltios durante 1:15 horas. Al terminar la corrida el gel es retirado de la cámara de electroforesis y posteriormente sumergido en solución de BE al 1% durante 15 minutos para visualizarlo con luz UV (rango 290-365nm) en el equipo FluorS-Multimager de Biorad.

Los productos amplificados fueron también visualizados en un gel poliacrilamida al 9.6%. El procedimiento para preparar un gel de poliacrilamida es el siguiente y se ilustra en la figura 1 del apéndice B: 1) Se lavan muy bien los vidrios y los separadores con jabón neutro y se enjuagan con agua destilada para dejar secar al medioambiente o en estufa. 2) Con una gasa impregnada de etanol al 75% se limpian los vidrios y se dejan secar. 3) Se arma la cámara de vaciado colocando los separadores entre los vidrios y ajustando el empaque externo alrededor de los vidrios con ayuda de las pinzas de presión. 4) Se

mezclan los reactivos mencionados en el número 2 del apéndice B en orden de aparición y se vacían de inmediato con una jeringa evitando la formación de burbujas. 5) Seguido de esto se coloca el peine y se deja polimerizar. 6) Una vez polimerizado, se retiran el peine y el empaque para colocar el gel en la cámara de electroforesis vertical que contiene a mortiguador de corrida al 1X. Las muestras se cargan de la misma forma que se menciona en gel de agarosa. El programa de corrida empleado fue de 150 voltios, 60 miliamperes y 20 wats durante 30 min para después teñirlo con BE y verlo con luz UV. El proceso de tinción para el gel de poliacrilamida es el mismo que para gel de agarosa.

2.5.4 Digestión con *Hpa* I

El corte de los productos de PCR para cada una de las muestras fue realizado con la enzima de restricción *Hpa* I. Dicha enzima es capaz de cortar en un solo punto al cDNA (780pb) derivado de los micoplasmas MG y MS usando los iniciadores MYC1 y MYC2. El sitio de corte por esta enzima (figura 2) para ambos micoplasmas se encuentra en diferente posición por lo que después de la digestión y posterior separación se aprecian dos fragmentos de distintos tamaños. Para MG se producen dos fragmentos de 500 y 280 pb, mientras que para MS se originan dos segmentos de 679 y 101 pb. Esto permite detectar y diferenciar ambos micoplasmas (García *et al.*, 1995). La enzima fue adquirida comercialmente a razón de 5U/ μ l. El proceso de digestión fue como sigue: Se mezclaron 17.5 μ l de producto de PCR con 2 μ l de buffer

para enzima y 0.5µl de enzima HpaI en tubos para microcentrífuga de plástico. La mezcla fue incubada a 37°C durante 1 hora agitando ligeramente la muestra a los 30 minutos.

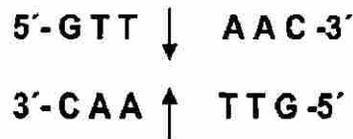


Figura 2. Secuencia reconocida por *Hpa* I. Secuencia de nucleótidos reconocida por la enzima de restricción *Hpa* I (Invitrogen™).



2.5.5 Visualización de productos de digestión

Para observar los fragmentos obtenidos después del corte, se preparó un gel de agarosa al 2%. El programa de electroforesis fue el mismo para visualizar productos amplificados. Se mezclaron 2µl de buffer de carga y 8 µl de producto digerido. El gel fue teñido con BE y visto en el transiluminador con luz UV. La visualización en gel de poliacrilamida de los productos de corte, se realizó de la misma forma que los productos de PCR.

2.6 Estimación del límite de detección del PCR

La sensibilidad del PCR fue estimada a partir de diluciones del ADN total obtenido de las cepas vacunales. Las vacunas se componen de entre 1.6 a 8.4 x 10⁸ UCC / ml. Se obtuvo el ADN de 1 ml de vacuna (ver 2.5.1) con volumen final de 50µl y este fue diluido a razón de 1:2, 1:3 y 1:9 con UPE. 3 µl de cada una de las diluciones fueron procesadas en el PCR y los resultados fueron registrados.

2.7 Eficacia del PCR-RFLP para la distinción molecular de MG y MS.

La capacidad de resolución del PCR-RFLP para la detección y diferenciación molecular de MS y MG fue establecida mediante la siguiente manera: Se mezclaron volúmenes de 1.5 µl (proporción 1:1) de ADN obtenido de cada uno de los micoplasmas. Esta mezcla fue posteriormente sujeta a PCR y RFLP como se describió previamente. Los resultados tanto del PCR como de la digestión con la enzima *Hpa* I se muestran en la sección de resultados. En este proceso, también se incluyeron controles positivos (ADN obtenido a partir de vacuna) para ambos micoplasmas, además de una muestra clínica positiva a MS y un control negativo (mezcla de PCR sin ADN) en reacciones PCR-RFLP independientes.

2.8 Mezcla de reacción de 50µl

Se realizó una disminución a la mitad de los ingredientes del PCR con el objetivo de eficientizar los recursos y disminuir el costo del análisis por muestra. Las cantidades necesarias para tener un volumen de reacción de 50µl fueron las siguientes: 2.1µl de Myc1 (940pmol), 2.1 de Myc2 (955pmol), 1.5µl de MgCl₂ (50mM), 5 µl de amortiguador (10X), 1 µl de dNTP's (10mM/u), 37.5 de H₂O UPE, 0.25µl de Taq polimerasa (5U/µl) y 1.5µl de ADN. El programa de Termociclador empleado fue el mismo que se utilizó para las muestras de 100µl.

2.9 Cultivo de vacunas comerciales y muestras clínicas

Para evaluar si las vacunas contra MG y MS contenían efectivamente microorganismos vivos y además verificar si existía crecimiento de los micoplasmas, tanto por observación directa en cultivo como por análisis de PCR, se preparó un medio basado en los protocolos recomendados por la Oficina Internacional de Epizootias (OIE). Sin embargo, existen otros medios de cultivo disponibles comercialmente, los cuales normalmente contienen como base una infusión de proteínas digeridas y extracto carne, además de un suplemento de suero o fracciones del suero, factores de levaduras, glucosa e inhibidores de crecimiento bacteriano (Tully, 1995), al igual que el medio recomendado por la OIE. Además de los controles vacunales, parte de las

muestras almacenadas en glicerol también se cultivaron y se analizaron con PCR.

2.9.1 Preparación del medio

Para el crecimiento de ambos micoplasmas se empleó el siguiente medio líquido compuesto de: una parte A: Base para caldo de Micoplasma (Becton Dickinson) (20 g/l) en agua destilada y una parte B: Suero de cerdo (calentado a 56°C durante 60 minutos), 25% (w/v) de extracto de levaduras, solución de glucosa al 10%, acetato de talio al 5% (w/v), 5 ml de penicilina G (200,000 UI/ml) y 20 ml de solución de fenol rojo al 0.1%. El pH fue ajustado a 7.8 con NaOH (0.1M). En el apéndice B se muestra la forma de preparación del medio.

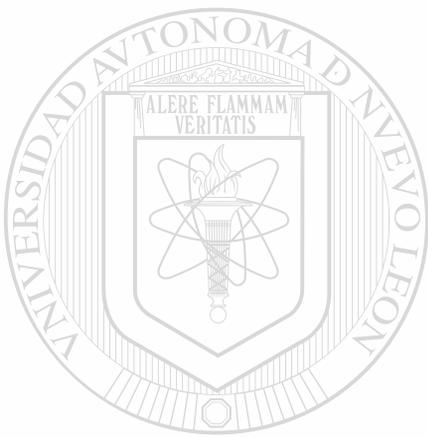
La parte A fue esterilizada en la autoclave a 120°C y 22 lb/pulg² durante 15 minutos. La parte A se dejó enfriar hasta debajo de 50°C y posteriormente fue mezclada con la parte B. Esta última fue previamente esterilizada por filtración con una membrana de 0.4µm (millipore®) de tamaño de poro.

2.9.2 Inoculación de microorganismos

Para cultivar los controles vacunales, una vez preparado el medio, se procedió a vaciar 17 tubos de vidrio de 180x16 con tapa de rosca con 5ml de medio cada uno. En grupos de 4, el grupo 1 se sembró con 0.2ml de MG, el

grupo 2 con 0.5 ml de MG, el grupo 3 con 0.2ml de MS y el grupo 4 con 0.5 ml de MS. Además, se dejó un tubo sin inocular como control negativo. Los tubos se incubaron con 7% de CO₂ a 37°C. La duración de la incubación fue por más de 3 días y/o hasta la aparición del cambio de color del medio de cultivo.

A partir de las muestras conservadas en glicerol sólo se cultivaron 0.5ml bajo las mismas condiciones previas.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1 Resultados de la obtención de ADN

3.1.1 ADN de antígenos y vacunas comerciales

Se decidió emplear como control positivo el ADN extraído a partir de las vacunas comerciales sobre los extractos a partir de antígenos para aglutinación, ya que estos últimos mostraron barridos al ser corridos electroforéticamente, además de sufrir una degradación muy rápida aún en congelación, ya que al ser empleados en el PCR a los tres días de ser extraídos no hubo indicio de ninguna amplificación, por lo cual se verificó nuevamente la calidad del ADN en gel de electroforesis sin observar ninguna banda que indicara la presencia de éste. Por tal motivo el antígeno para aglutinación no fue empleado como control positivo en la presente investigación. Por otra parte, el ADN extraído de las vacunas comerciales se empleó como control durante todos los experimentos del presente trabajo, no evidenciando decremento en su calidad.

En las figuras 3 y 4 se muestran las separaciones electroforéticas del ADN para confirmar la presencia y relativa concentración del ADN obtenido a partir de los antígenos y vacunas comerciales.

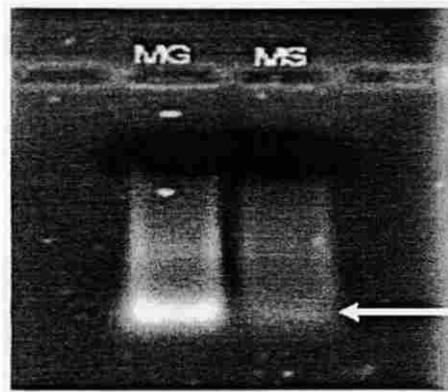


Figura 3. ADN a partir de antígeno comercial. Visualización del ADN de MG y MS obtenido a partir de una suspensión de micoplasmas empleados como antígenos en la prueba de aglutinación. El ADN (flecha), separado electroforéticamente en un gel de agarosa al 0.8%, es observado bajo luz ultravioleta posterior a la tinción con BE.

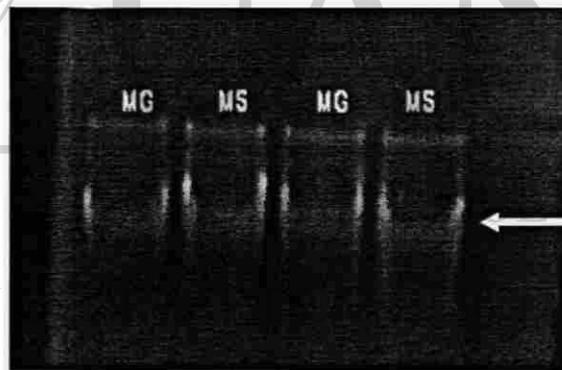


Figura 4. ADN a partir de vacunas. Visualización en gel de agarosa al 0.8% de ADN (flecha) proveniente de las vacunas comerciales para MG y MS. Tinción con BE y observado a través de luz UV.

3.1.2 ADN de muestras clínicas

La obtención de ADN de las muestras clínicas se realizó bajo el protocolo mencionado anteriormente en material y métodos; sin embargo, la

concentración de este, no pudo ser visualizado en geles de agarosa o poliacrilamida, ya que la cantidad obtenida fue diluida en poco volumen (20µl), de los cuales 3µl se emplearon directamente para la amplificación en PCR.

3.2 Resultados del PCR-RFLP de vacunas comerciales

3.2.1 Productos amplificados y digeridos a partir de vacunas comerciales.

Los resultados obtenidos para PCR de los controles vacunales se muestran en la figura 5, en esta se puede apreciar los productos amplificados de 780pb a partir de las vacunas comerciales de ambos micoplasmas.

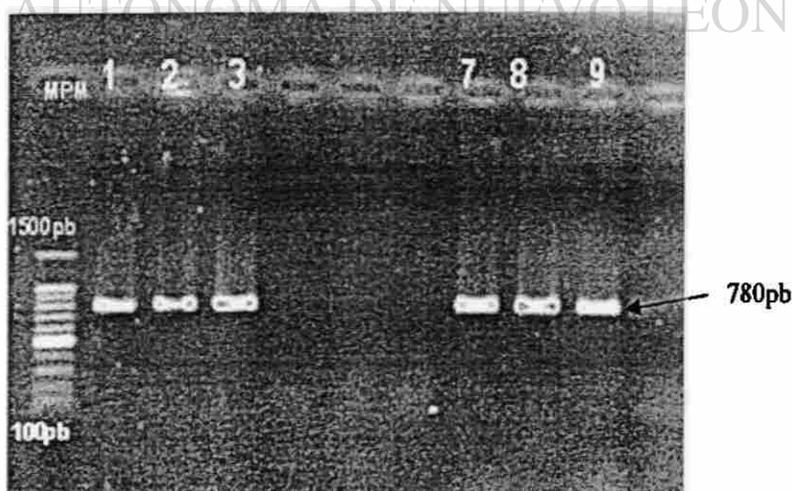


Figura 5. Productos amplificados de vacunas comerciales. Controles positivos de PCR a partir de ADN de las vacunas comerciales para MG y MS. Los carriles 1-3 corresponden a MG y los carriles 7-9 corresponden a MS. Los controles negativos se incluyeron en los carriles 4-6. En la primera línea (MPM) se observa el corrimiento del marcador de peso molecular (Invitrogentm).

Por otro lado, los resultados obtenidos después del corte con *Hpa* I se muestran en la figura 6. En la que se observan los diferentes patrones de corte para ambos micoplasmas.

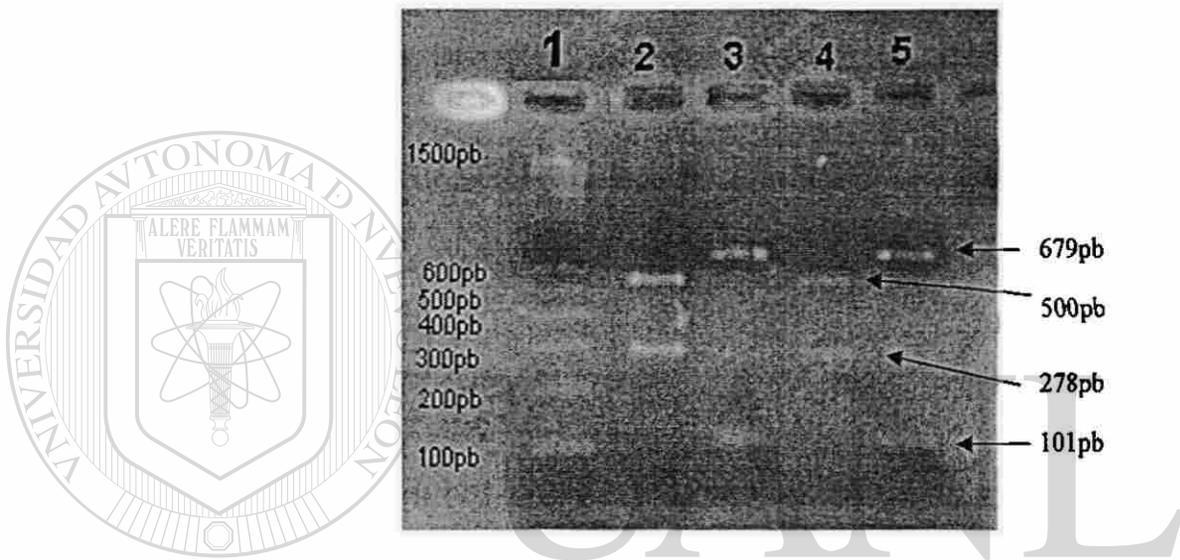


Figura 6. Productos de corte de vacunas. Visualización en gel de agarosa de los productos de corte con *Hpa* I para los productos amplificados de MG y MS a partir de ADN de vacunas comerciales. En el carril 1 se ubicó el marcador de peso molecular de 100-1500pb (100bp DNA Ladder, Invitrogentm), en los carriles 2 y 4 control positivo de MG. En los carriles 3 y 5 controles positivos para MS. El carril 6 es un control negativo.

3.3 Resultados del PCR-RFLP de muestras clínicas

3.3.1 Productos amplificados y digeridos a partir de muestras clínicas

Los resultados obtenidos mediante la PCR-RFLP se muestran en la tabla VIII. En esta se establece que, las aves de engorda y reproductoras de 38

semanas con antecedentes de diagnóstico negativo para MG y MS, se mantuvieron negativos en el PCR-RFLP. Por otra parte, aves ponedoras (de 3 y 28 semanas de edad) que manifestaban signos clínicos sugestivos de infección por MG resultaron negativas al PCR-RFLP. No obstante, de un lote de 17 aves reproductoras de 38 semanas analizadas procedentes de una explotación diferente de las otra reproductoras, 15 resultaron positivas a la detección de micoplasmas mediante el PCR sencillo (Figura 7). Después de ejecutar el corte de los productos de PCR, mediante la enzima *Hpa* I, se obtuvo un patrón similar al obtenido con los controles de MS (Figura 6).



TABLA VIII RESULTADOS DEL PCR-RFLP

Cantidad de animales y tipo de explotación	Edad (semanas)	Diagnóstico previo			PCR-RFLP			
		SC +/-	Ag +/-	ELISA +/-	MG+	MG-	MS +	MS-
10 ^(&) Pollo engorda	6	10-MG 10-MS	10-MG 10-MS	10-MG 10-MS	0	10	0	10
10 Ponedoras ^(*)	3	10+MG			0	10	0	10
10 Ponedoras ^(*)	28	10+MG			0	10	0	10
17 ^(**) Reproductoras	38	17+MG 17+MS	17+MG 17+MS	17+MG 17+MS	0	17	15	2
10 Reproductoras ^(&)	38	10-MG 10-MS	10-MG 10-MS	10-MG 10-MS	0	10	0	10

SC: signos clínicos, Ag: prueba de aglutinación en placa, ELISA: detección de la infección mediante ELISA. (*) animales con signos clínicos respiratorios sugestivos de micoplasmosis. (**) Animales vacunados contra MS (MS-H) y MG (TS-11) a las 7 y 9 semanas de edad

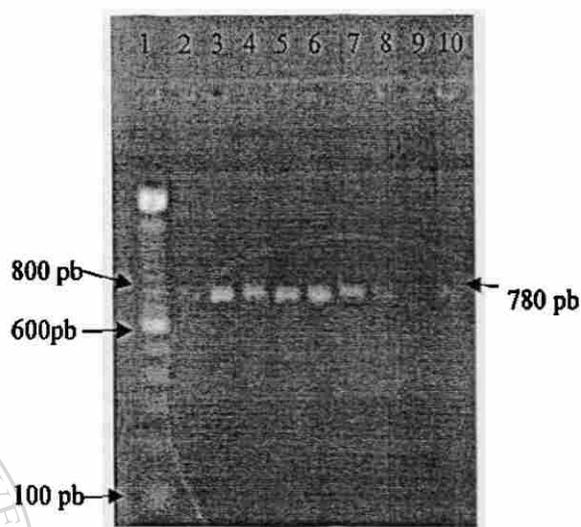


Figura 7. Productos amplificados a partir de muestras clínicas. Visualización de productos de PCR de muestras clínicas en gel de agarosa al 2%. En el carril 1 el marcador de peso molecular. Los carriles del 2-8 se refieren a muestras clínicas positivas en las que se amplificó un producto de 780pb, los carriles 9 y 10 corresponden a los controles negativo y positivo respectivamente.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

Los resultados obtenidos de la digestión de los productos de PCR a partir de las muestras clínicas se muestran en las figuras 8 y 9. Los fragmentos producidos después del corte con la enzima *HpaI*, sobre estos productos, fueron de 679 y 101 pb. De acuerdo a García *et al.*, 1995 la generación de estos fragmentos nos permite establecer que el organismo presente en estas muestras corresponde a MS.

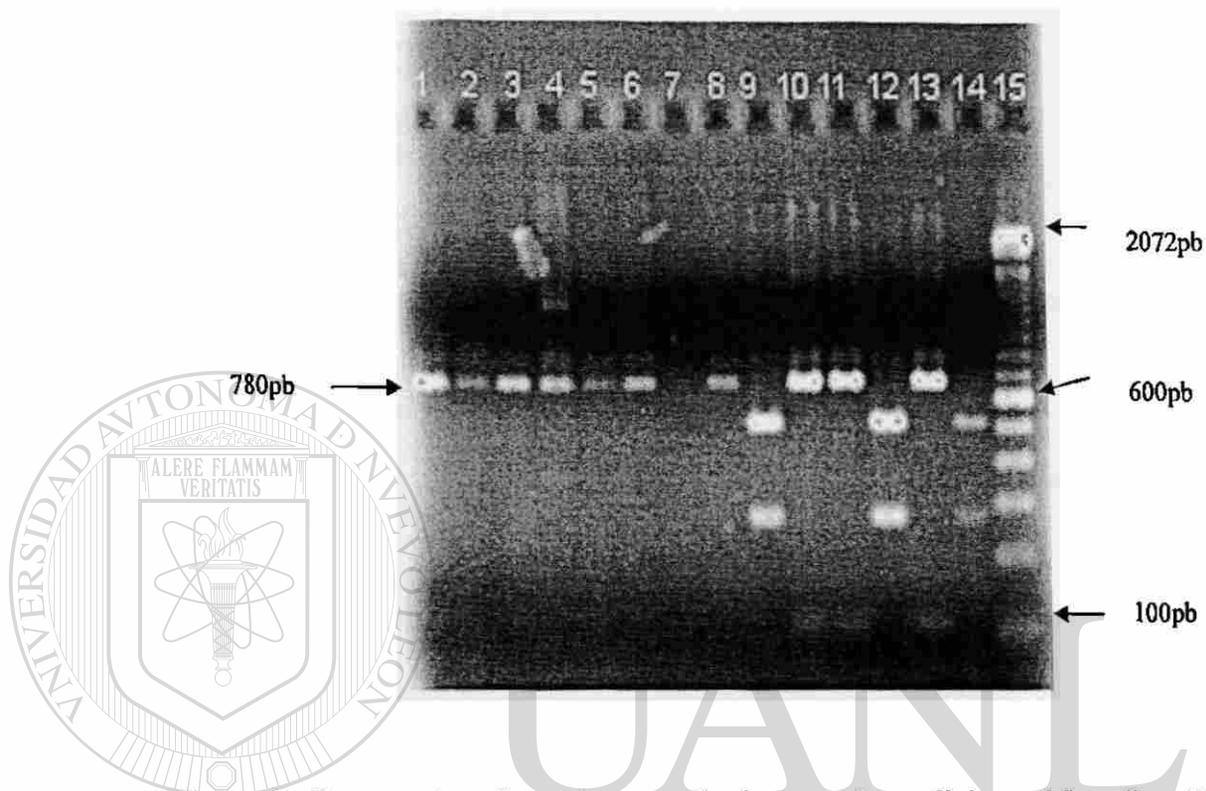
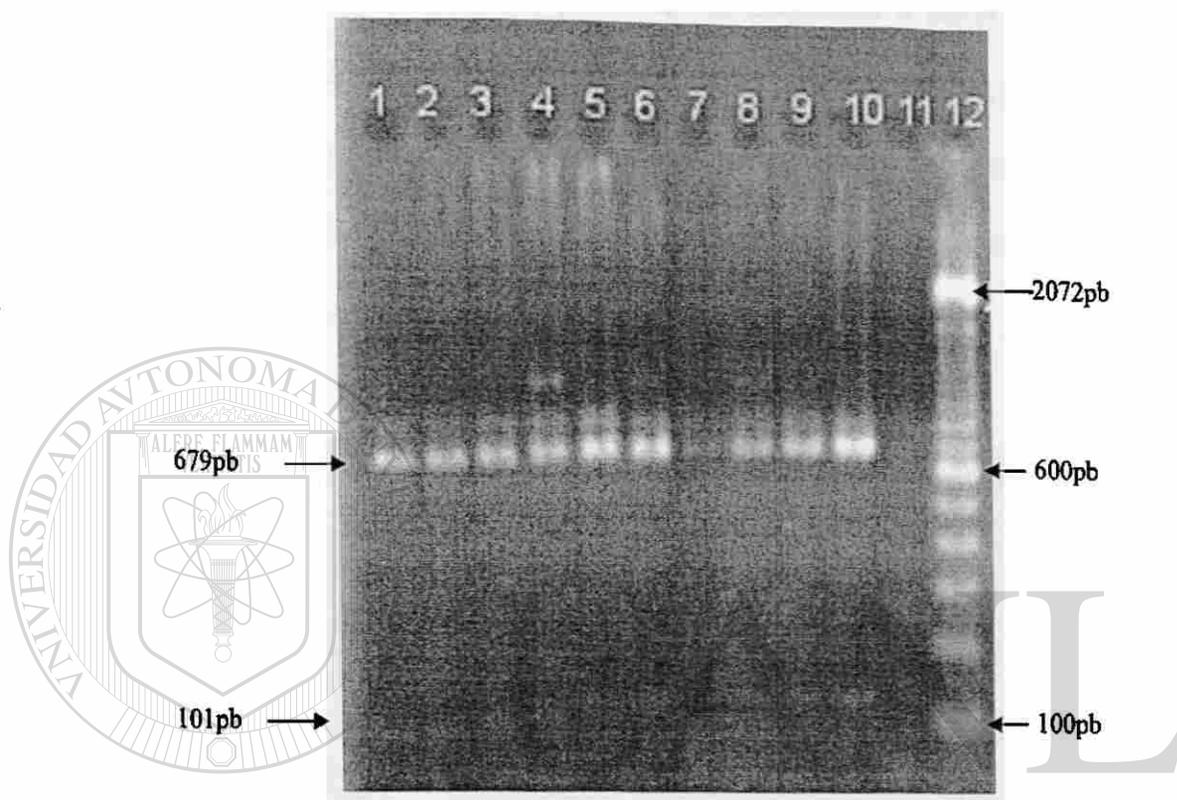


Figura 8. Fragmentos de corte a partir de muestras clínicas. Visualización en agarosa al 2% de los productos de digestión con *Hpa* I de las muestras clínicas. Los carriles del 1-6 corresponden a muestras clínicas. El carril 7 corresponde al control negativo, el carril 8 corresponde a una repetición de la muestra 6. Los carriles 9, 12 y 14 son controles vacunales de MG. Los carriles 10, 11 y 13 son controles vacunales para MS. El carril 15 es el marcador de peso molecular.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Figura 9. Fragmentos de corte a partir de muestras clínicas. Visualización en agarosa al 2% de los productos de la digestión con *Hpa* I. Los carriles del 1-9 corresponden a muestras clínicas de aves ponedoras. El carril 10 corresponde al control vacunal de MS. El carril 11 es un control negativo. El carril 12 es el marcador de peso molecular. En el carril 7 se observa una muestra negativa a MS.

3.4 Resultados de la estimación del límite de detección

Los resultados de los productos amplificados a partir de las diluciones realizadas, las cuales fueron 1:9, 1:3 y 1:2 respectivamente, mostraron que en todas las diluciones fue posible detectar el producto amplificado, sin embargo conforme la dilución fue mayor, la visualización disminuyó. Ver figura 10.

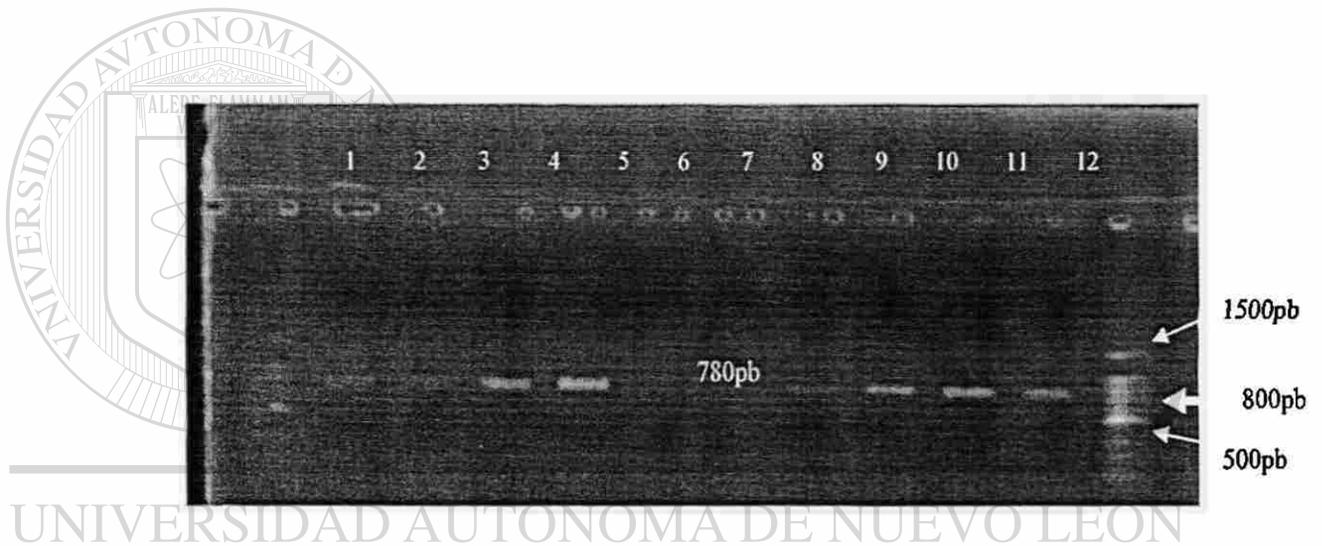


Figura 10. Productos de amplificación a partir de diluciones. Visualización de los productos de amplificación (~780pb) de micoplasmas vacunales (MG: cepa ts-11, Meril Select Inc.; y MS: cepa MS-H, Avimex, S.A. de C.V.) diluidos acorde a lo señalado en el texto. Los carriles 1 y 12 corresponden al marcador de peso molecular (100bp DNA Ladder, Invitrogen[™]). En los carriles del 2 al 5 conciernen a las amplificaciones de las diluciones hechas para MS mientras que en los carriles 8 al 11 se muestran los productos de PCR para MG, respectivamente. En los carriles 6 y 7 se depositaron los controles negativos para MG y MS, respectivamente.

3.5 Resultados de la eficacia del PCR para distinción molecular de MG y MS

Los resultados obtenidos para la verificación de la mezcla de ADN de ambos micoplasmas se observa en las figuras 11 y 12 respectivamente, en la primera se observan los productos amplificados en PCR en la cual se observa que todos los controles amplificaron un fragmento de 780pb y en la segunda se observan los controles una vez sometidos a digestión con *Hpa*I. Las muestras se refieren a 2 muestras control para MG, una muestra con ADN de ambos micoplasmas, además de 1 muestra positiva a MS y un control negativo.

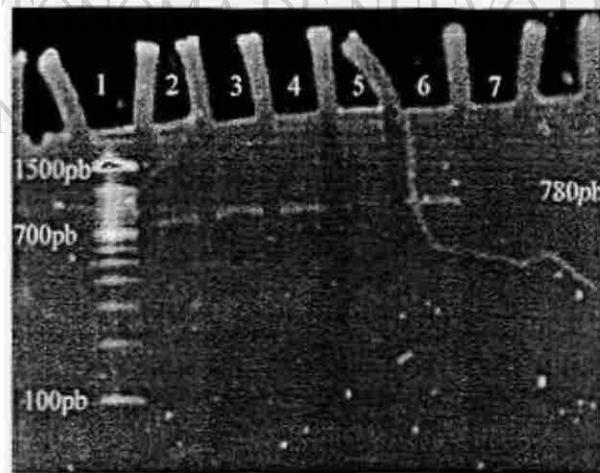


Figura 11. Productos amplificados a partir de ADN mezclado. Visualización producto de mezcla de controles de ADN en gel de poliacrilamida al 9.6%. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular, en el carril 2 un control para MG, carril 3 un control de MS, carril 4 ADN mezclado, carril 5 control de MG, carril 6 muestra clínica de MS y carril 7 control negativo.

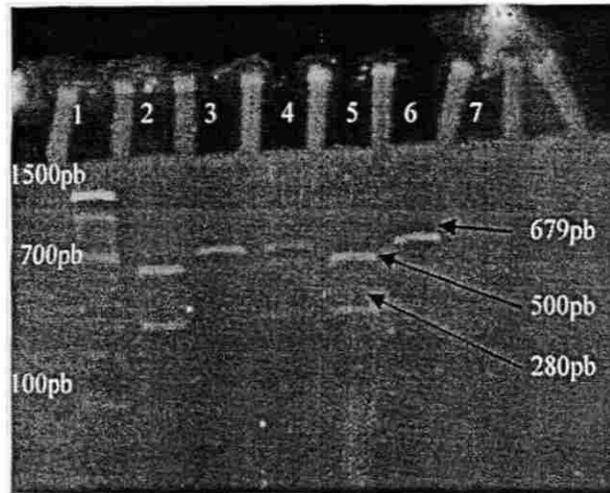


Figura 12. Fragmentos de corte a partir de ADN mezclado. Visualización de productos de digestión de la mezcla de controles de ADN en gel de poliacrilamida al 9.6%. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular, en el carril 2 un control para MG, carril 3 un control de MS, carril 4 ADN mezclado, carril 5 control de MG, carril 6 muestra clínica de MS y carril 7 control negativo.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIONES 3.6 Resultados para las mezclas de reacción de 50µl

Los productos amplificados y de digestión de las muestras comparativas de reacciones de 50µl se observan en las figuras 13 y 14 respectivamente. En la cual se corrieron 8µl de cada mezcla de reacción mezcladas con 2µl de amortiguador de carga en un gel de poliacrilamida al 9.6% que fue teñido con BE.

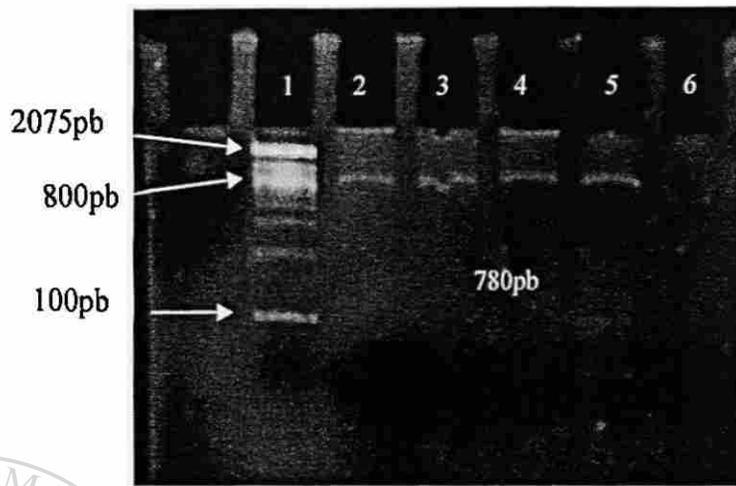


Figura 13. Productos amplificados de mezcla de reacción de 50 μ l. Visualización de productos de PCR de reacciones de 50 μ l. El número 1, corresponde al marcador de peso molecular (Invitrogen™). Los números 2 y 5 corresponden a MG (780pb) mientras 3 y 4 corresponden a MS (780pb). El número 6 es un control negativo.

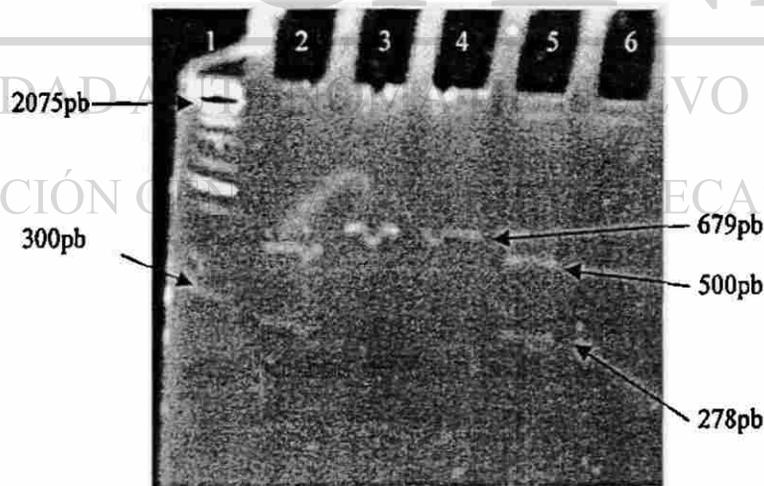


Figura 14. Fragmentos de corte a partir de mezcla de reacción de 50 μ l. Visualización de productos de corte de *Hpa* I de mezclas de reacción de 50 μ l en gel de poliacrilamida al 9.6%. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular. En los carriles 2 y 5 se aprecian los productos de corte (500pb y 280pb) de la amplificación para MG. Los números 3 y 4 se refieren a productos de corte para MS (solo visible el fragmento de 679pb). El carril 6 es un control negativo.

En ambas imágenes se puede apreciar que las bandas fueron menos intensas, pero aún así su observación es la suficiente para detectar las amplificaciones de los micoplasmas y para discriminar entre ellos a partir de 1.5µl de extracto crudo sometido a PCR.

3.7 Resultados del cultivo de las vacunas comerciales

Luego de 2 días posteriores a la inoculación, casi todos los tubos, excepto el tubo control, manifestaron cambio de color, de un tono rojo hacia un tono amarillo, lo cual es característico del indicador fenol rojo cuando se encuentra en un medio ácido. El medio se vuelve ácido debido a la fermentación de la glucosa por parte de *Mycoplasma* (MG y MS). Los tubos se observaron de color amarillo sin ninguna turbidez (Figura 15).



Figura 15. Crecimiento de micoplasmas en tubos de cultivo. Se observan 5 tubos considerados positivos por el cambio a color amarillo, de diferente intensidad, del medio y un control negativo por el color rojo.

Estos resultados sugieren fuertemente que efectivamente sí hubo multiplicación de los microorganismos vacunales; al realizar el PCR de estos cultivos y verificar su amplificación (Figura 16), se aprecia que la intensidad de las bandas fue muy similar entre los cultivos inoculados con 0.2 y 0.5ml de suspensión vacunal. No obstante, al comparar la intensidad entre las bandas de estos cultivos con las bandas obtenidas directamente de la vacuna se observó mayor intensidad en estas últimas.

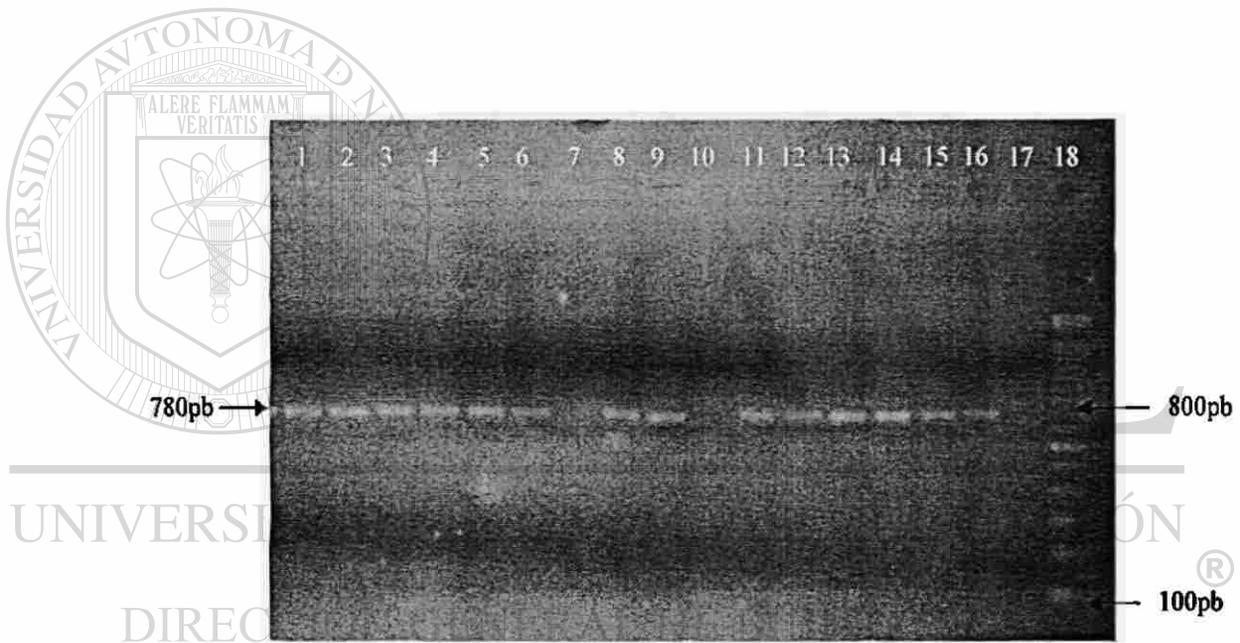


Figura 16. Productos amplificados de vacunas cultivadas. Visualización en gel de agarosa al 2% de los productos amplificados a partir de vacunas cultivadas. En el carril 18 se muestra el patrón de bandas del marcador de peso molecular. Los carriles del 1 al 16 corresponden a muestras vacunales sometidas a cultivo. En 14 de las 16 muestras (1-6, 8 y 9 y 11-16) se observó un producto de 780pb; mientras que en dos (7 y 10) no se obtuvo evidencia de amplificación. El carril 17 corresponde al control negativo.

Por otra parte, los resultados obtenidos para productos de corte de las cepas vacunales después de cultivarse pueden observarse en la figura 17, en la que se muestran un número representativo de las

digestiones realizadas. La separación electroforética fue realizada en gel de agarosa a 2% preparado acorde a los descritos en material y métodos. Se observó una deficiente resolución para evidenciar los fragmentos generados por la digestión; lo cuál fue muy difícil registrar con el FluorS-Multimager ®. Los fragmentos generados correspondieron a 500 y 280 pb para la vacuna cultivada de MG y de 679 y 101 pb para MS.

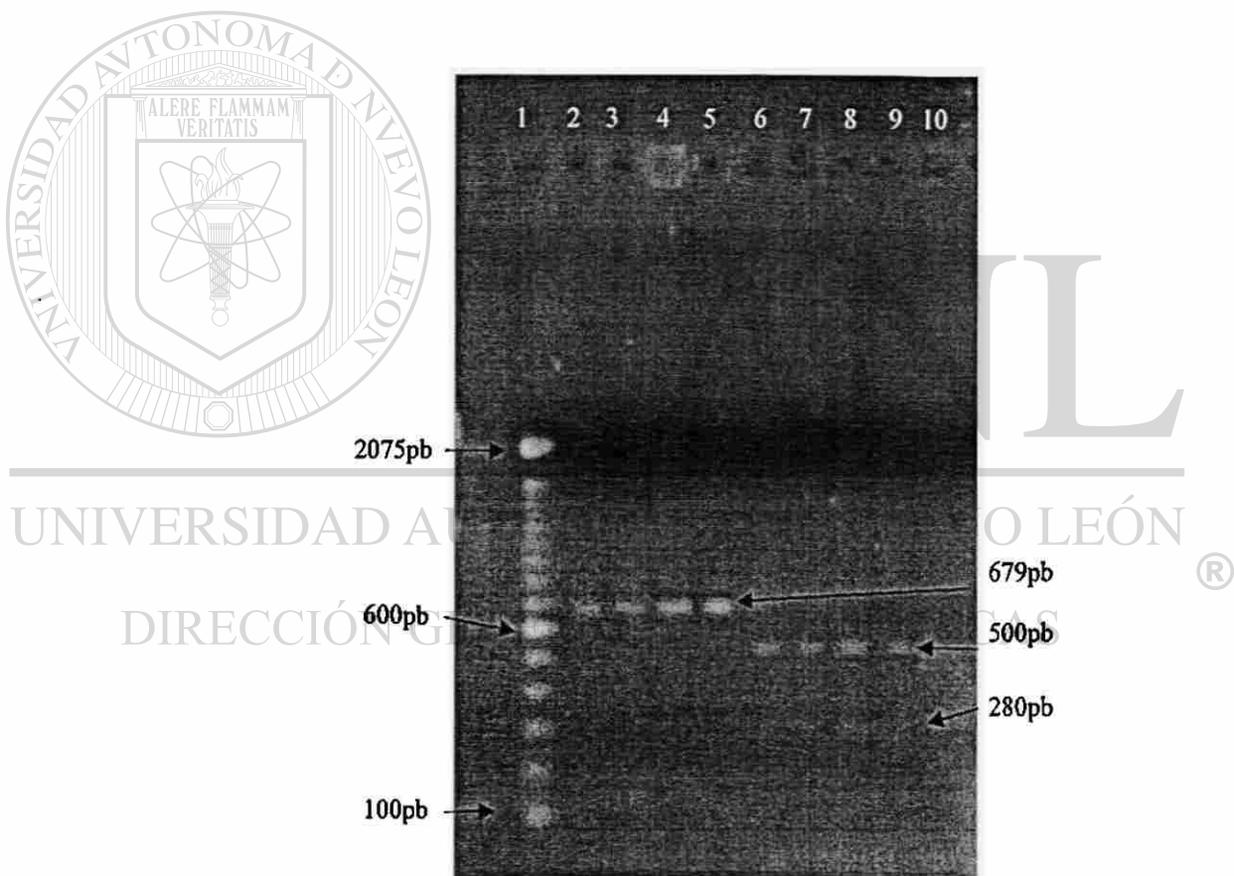
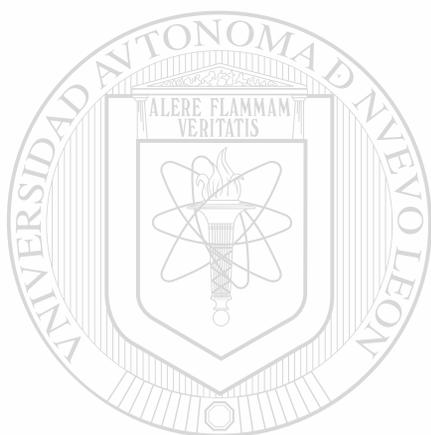


Figura 17. Fragmentos de corte de vacunas cultivadas. Gel de agarosa al 2% en el que se observan los productos de corte de *Hpa* I para las amplificaciones a partir de vacunas cultivadas. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular. Los carriles del 2-5 corresponden a MS y los carriles 6-9 corresponden a muestras de MG. El carril 10 es un control negativo.

De las muestras clínicas conservadas en glicerol a -40°C que fueron cultivadas bajo las mismas condiciones que las vacunas, no se observó ningún indicio de crecimiento a simple vista, ya que el medio de cultivo no registró cambio de color a las 24 horas, ni a las 48 horas. Por lo cual se decidió esperar hasta 10 días tras los cuales las muestras fueron catalogadas como negativas tal como lo reporta la OIE, después del tiempo de espera.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO 4

DISCUSIÓN

Los micoplasmas son una de las entidades contagiosas más importantes para la industria avícola (Levinson y Kleven, 2000). Las pérdidas inducidas por estos agentes infecciosos de aves son múltiples, sobretodo si no se establecen medidas de prevención ó se rompen las medidas de bioseguridad en las granjas (Calnek, 1997). Los micoplasmas patogénicos más importantes en las explotaciones avícolas son: *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synoviae* (MS), *Mycoplasma meleagridis* (MM) y *Mycoplasma iowae* (MI). MG ocurre mundialmente, es el micoplasma de mayor significancia como causa de daño respiratorio y descensos en la producción y está considerado por la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) como una enfermedad de reporte obligatorio

(OIE, 2004). En el caso de MS, si bien no es reconocido como por la OIE como un patógeno de reporte obligatorio, al igual que MG la mayoría de las infecciones ocurren de forma subclínica, posee similares vías de diseminación entre las parvadas y se le ha asociado fuertemente en brotes de infección respiratoria, ya sea sólo o asociado a otros patógenos (Calnek, 1997). De esta forma, tanto la detección oportuna y/o diagnóstico diferencial específico de ambos micoplasmas resulta esencial para la prevención, control y eventual erradicación de estas infecciones. Actualmente los procesos diagnósticos involucran desde el aislamiento (medios de cultivo y/o inoculaciones en embriones o pollos libres en anticuerpos antimicoplasma) en el laboratorio y pruebas serológicas hasta la detección molecular. El aislamiento de estos

agentes resulta complicado debido a lo "fastidioso" en su replicación *in vitro* (Fan *et al.*, 1995) en parte debido a sus exigencias nutricionales, la lentitud en su desarrollo, el requerimiento de entrenamiento y equipo adecuado (García *et al.*, 1995) Los métodos serológicos normalmente se recomiendan como métodos de monitoreo de infección en parvadas sospechosas e incluyen comúnmente a las pruebas de aglutinación rápida de suero (ARS), Ensayo Inmunológico Ligado a Enzima (ELISA) e Inhibición de la hemoaglutinación (IHA), entre otros (OIE, 2004). Las limitantes del uso de las pruebas serológicas son la gran proporción de reacciones inespecíficas y la carencia de sensibilidad y por ende genera dificultades para identificar al micoplasma causal en la parvada o animal enfermo (Levinshon y Kleven 2000). Recientemente, se han reportado que los métodos de detección molecular de micoplasma patogénicos representan una buena alternativa a los métodos de detección tradicionales (Kempf, 1998). Ha la fecha, se han reportado varios procedimientos basados en esta tecnología, diseñados tanto para detectar la presencia de MG y MS o ambos, e inclusive la detección de varios patógenos a partir de una sola muestra (Fan *et al.*, 1995, García, *et al.*, 1995, Pang *et al.*, 2002). Una modificación de estos métodos de detección molecular incluso se encuentra disponible comercialmente (Salisch *et al.*, 2000). No obstante, estos procedimientos aún no se han validado a partir de muestras clínicas o brotes de micoplasmosis. La disposición de esta herramienta diagnóstica, en tales casos, definitivamente coadyuvaría en forma determinante en control de brotes y monitoreo de parvadas con problemas o antecedentes de esta enfermedad. En el presente trabajo, basado en una

metodología previamente reportada por García *et al.*, 1995, se estableció la detección y diferenciación molecular tanto de MG como de MS ya sea a partir de controles positivos (Vacunas contra MS y MG y / o antígenos usados en los procedimientos de aglutinación para el diagnóstico serológico de la infección) como en muestras clínicas procedentes de animales sospechosos a ambos micoplasmas. Este método, que implica la amplificación inicial de una secuencia de ARNr (ARN ribosomal 16S) específica de micoplasmas con posterior uso de enzimas de restricción, mismas que reconocen secuencias sumamente específicas ya sea para MG como para MS (García, 1995), fue capaz de diferenciarnos ambos patógenos tanto en controles como en muestras clínicas. Dos grupos analizados (dos lotes de ponedoras de una granja de aves con edades múltiples) y no vacunados contra MG y/o MS, con antecedentes clínicos de enfermedad respiratoria y fuertemente sospechosos de micoplasmosis, resultaron negativos al PCR. Para ambos grupos desafortunadamente no fue posible obtener datos de su seroreactividad contra micoplasmas; sin embargo, basados en los resultados de los controles positivos y negativos; en este estudio fueron considerados negativos. Otros dos grupos (un lote de pollos de engorda y otro de reproductoras) sin antecedentes clínicos o sospecha de enfermedad respiratoria y con serología negativa arrojaron los mismos resultados. Un último grupo de aves de 38 semanas de edad, compuesto de 17 reproductoras que recibieron vacuna contra MS (MS-H) y MG (TS-11) a las 7 y 9 semanas de vida, con signos evidentes de infección respiratoria y baja mortalidad resultaron serológicamente (ELISA e aglutinación

en placa) positivas contra ambos micoplasmas. Dado el antecedente de vacunación hasta ese momento fue difícil establecer la participación de ya sea MS ó MG por separado, combinados o en asociación con otros patógenos aviares en el síndrome respiratorio. Después de ejecutar el PCR-RFLP fue posible determinar que el micoplasma involucrado en este caso fue MS (ver figura 8 y tabla VIII). Algunos autores han reportado que el uso de vacunas vivas permite la colonización del tracto respiratorio superior, permitiendo un buen nivel de inmunidad y protección (Whithear, 1996). Así mismo, para el caso de la vacuna de MS (MS-H) se ha reportado que después de la vacunación este micoplasma persiste (determinado mediante cultivo) por más de 55 semanas en tráquea (Markham, *et al.*, 1998). Sin embargo, en el caso de MG (cepa ts-11, empleada en estos animales) persiste durante toda la vida del animal (Whithear, 1996). Al respecto, no fue posible detectar un patrón de restricción similar a lo observado para MG, pero sí para MS. Tal situación pudo deberse, entre otros factores, a que ocurrió un "sobrecrecimiento" de MS de tal forma que la población de MG en tráquea fue mínima como para no ser detectada mediante el procedimiento aquí establecido. Una situación algo similar ha sido reportada por García *et al.*, 1995 quien sugirió que el ADN de MS es preferentemente amplificado con respecto a MG en muestras mixtas, obteniendo como resultado una disminución en la sensibilidad de detección de MG. Lo cual, tal vez es el resultado de la formación de estructuras secundarias dentro (y probablemente alrededor) del sitio de reconocimiento del 16S rRNA por parte de los iniciadores en MG pero no así en MS. Por otra parte, otra

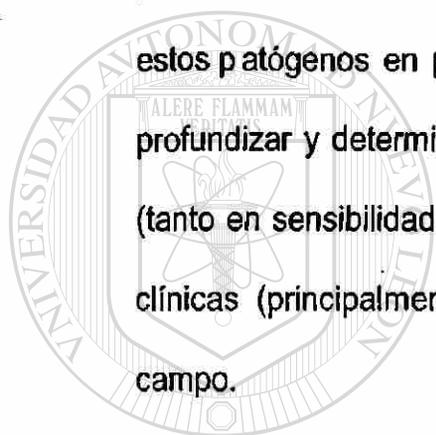
posibilidad pudiera resultar del hecho que la cepa vacunal MG no fue capaz colonizar tráquea lo que resultó en una ausencia de MG hasta el momento de presentar el síndrome respiratorio. La última posibilidad, y no menos importante, radica en que realmente se trató de un brote de MS y que la cepa detectada fue una cepa de campo. Desafortunadamente, no fue posible aislar al micoplasma de estas muestras ante la ausencia de crecimiento de cualquier micoplasma. En particular, para este grupo de animales fue establecida una terapia de antibióticos a base de tetraciclinas a dosis altas con el propósito de controlar el brote (Valladares, comunicación personal). Tal situación pudo de hecho eliminar la población de MS y MG vacunales (y probablemente de cepas de campo) de tal suerte que el ADN detectado fue de micoplasmas no viables depositados aún en tráquea, que a su vez resultó en los conceptos discutidos anteriormente.

Otros autores han encontrado dificultad para aislar MS a partir de animales serológicamente positivos (Avakian *et al.*, 1992). No obstante se requieren profundizar en la dinámica poblacional de micoplasmas después del uso de antibióticos y su correlación con la detección / diferenciación de ambos micoplasmas mediante PCR-RFLP.

Por otra parte, mediante el protocolo aquí establecido no se puede determinar si las muestras positivas a MS correspondieron a cepas de campo o vacunales. No obstante, se sugiere analizar los factores moleculares de atenuación (de ser posible de cada vacuna) y a partir de ellos diseñar un protocolo que permita tal discernimiento. Lo cual favorecería bastante en el

seguimiento de brotes asociados a micoplasmosis en parvadas vacunadas contra ambos micoplasmas.

Finalmente, la adaptación del protocolo basado en PCR-RFLP para la detección y diferenciación de MS y MG se encuentra disponible para el sector avícola ante la sospecha de participación de tanto de MS o de MG o ambos en parvadas de diferentes tipos de explotación e inclusive para el seguimiento de estos patógenos en poblaciones de aves silvestres. No obstante, se requiere profundizar y determinar si este conjunto de procedimientos resultan efectivos (tanto en sensibilidad, especificidad y valor predictivo) en todas las situaciones clínicas (principalmente la que afectan al tracto respiratorio) posibles en el campo.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

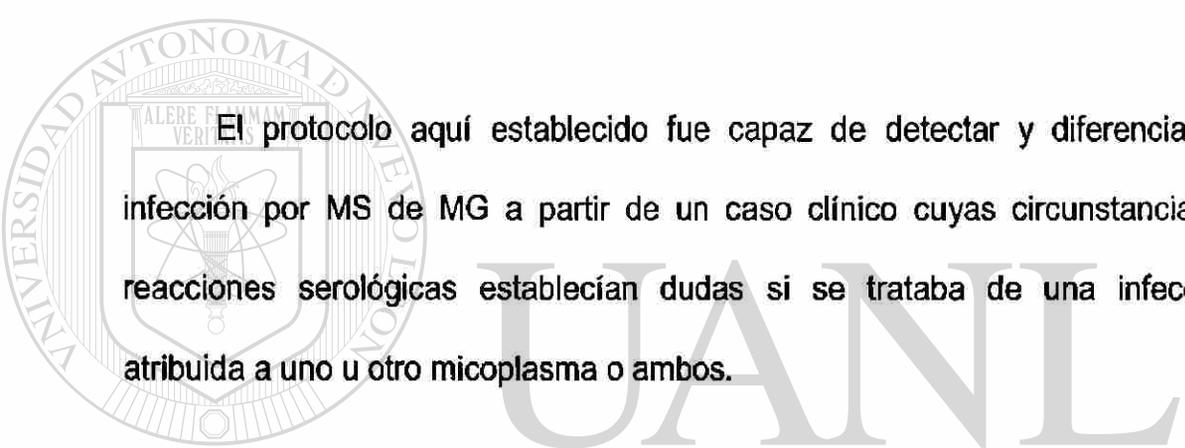
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La detección molecular de *Mycoplasma gallisepticum* (MG) y *Mycoplasma synoviae* (MS) mediante PCR-RFLP tuvo mayor eficacia como herramienta diagnóstica, basada en su sensibilidad y especificidad, comparada con los métodos de serología.



El protocolo aquí establecido fue capaz de detectar y diferenciar la infección por MS de MG a partir de un caso clínico cuyas circunstancias y reacciones serológicas establecían dudas si se trataba de una infección atribuida a uno u otro micoplasma o ambos.

En el presente trabajo fueron usadas exitosamente las cepas Ts-11 de MG y MS-H de MS como controles positivos en el PCR-RFLP. En este sentido, es reportado el uso de tales cepas como controles a diferencia del estudio de García y col., 1995, quienes no incluyeron la cepa MS-H en su protocolo. No obstante se recomienda ampliar estas observaciones bajo situaciones controladas y/o de campo para confirmar la aplicación del PCR-RFLP en muestras clínicas.

Con referencia a las condiciones en que se desarrollo la técnica y en particular a la extracción de ADN se concluye que las vacunas comerciales pueden ser empleadas satisfactoriamente como controles positivos para

estudios de esta naturaleza, siendo mejor la calidad de ADN extraído a partir de ellas, no así el ADN a partir del antígeno para aglutinación, ya que se observó una menor calidad al emplearlo recién extraído y que además esta decrece rápidamente aún en congelación, debido tal vez al efecto de los residuos del cristal violeta sobre el ADN.

Otra situación importante que consideramos concluyente es destacar lo importante que fue encontrar que la concentración de $MgCl_2$ reportada por García *et al.*, 1995, en la cual se basó gran parte de la investigación, se encontraba más elevada de los parámetros normales para una condición estándar de PCR ya que al principio de nuestro trabajo el adicionar el $MgCl_2$ a esta concentración nos provocó dificultades en la amplificación. En el artículo de García *et al.*, 1995 se reporta adicionar el $MgCl_2$ a una concentración final de 4mM en 100 μ l de volumen final por lo que se modificó la concentración disminuyéndola hasta 1.5mM en la mezcla final y con esto se observaba una buena amplificación, esta concentración está de acuerdo a lo establecido por Sambrook y Russell, 2001. Por otra parte, en lo referente a la disminución de los ingredientes del PCR, se puede concluir que el disminuir a la mitad las cantidades empleadas en la mezcla de PCR en las mezclas de reacción a 50 μ l no influye en la apreciación de los productos amplificados, así como tampoco causará una discrepancia al interpretar los resultados. Así mismo en lo referente a las posibles coinfecciones de MG y MS, la prueba es eficaz para detectar ambos microorganismos en una misma muestra.

En cuanto al cultivo de las muestras clínicas se puede concluir que el hecho de no haber existido evidencia de crecimiento pudo deberse, entre otros factores, a que la población de micoplasmas presentes en la tráquea de estos animales era tan poca o estaban muertos debido al tratamiento con antibióticos que se les había implementado o que las condiciones del medio de cultivo no fueron estrictamente las óptimas para soportar el crecimiento de este tipo de microorganismos. Por otro lado, es probable que la deficiente resolución observada en las bandas amplificadas de los cultivos de muestras clínicas, se deba también a la presencia de inhibidores del PCR de los propios ingredientes del cultivo que no están presentes en las vacunas comerciales.

Por último, con el presente trabajo queda de manifiesto que la prueba de PCR-RFLP además de emplearse efectivamente como herramienta diagnóstica de ambos micoplasmas, también puede usarse como un método para evaluar el grado y eficacia de la inmunización aplicada como manejo en las parvadas de aves de producción, haciendo posible la evaluación del nivel de colonización y calidad de las vacunas vivas así como su correcta aplicación.

LITERATURA CITADA

1. Adler, H.E., Yamamoto, R., and Berg, J. 1957. Strain differences of pleuropneumonia-like organisms of avian origin. *Avian Dis* 1:19-27.
2. Adler, H.E. and DaMassa, A.J. 1968. Effect of dextrose in medium for the preparation of *Mycoplasma gallisepticum* plate antigens. *Appl Microbiol.* Apr 16(4):558-62. PMID: 5647514.
3. Arzey, G.G. and Arzey, K.E. 1992. Successful treatment of mycoplasmosis in layer chickens with single dose therapy. *Aust Vet J Jun*;69(6):126-8.
4. Avakian AP, Ley D.H., Berkhoff J.E., and Ficken M.D. 1992. Breeder turkey hens seropositive and culture-negative for *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis Jul-Sep*;36(3):782-787.
5. Avakian, A.P. and Kleven S.H. 1990. The humoral immune response of chickens to *Mycoplasma gallisepticum* and potential causes of false positive reactions in avian micoplasma serology. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg (Suppl 20)*: 500-512.
6. Bencina, D., Tadina, T. and Dorrer, D. 1988a. Natural infection of ducks with *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma* egg transmission. *Avian Pathol* 17:441-449.
7. Bencina, D., Tadina, T. and Dorrer, D. 1988b. Natural infection of geese with *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* and egg transmission of the micoplasmas. *Avian Pathol* 17:925-928.
8. Bencina, D., and Bradbury, J.M. 1991. Indirect immunoperoxidase assay for the detection of antibody in chicken micoplasma infections. *Avian Pathol* 20: 113-124.
9. Bencina, D., Tadina, T. and Dorrer, D. 1987. *Mycoplasma* species isolated from six avian species. *Avian Pathol* 16:653-664.

10. Bozeman, L.H., Kleven, S.H. and Davis, R.B. 1984. *Mycoplasma* challenge studies in budgerigars (*Melopsittacus undulates*) and chickens. *Avian Dis* 28:426-434.
11. Brown, M.B., Stoll, M.L, Scasserra, A.E. and Butcher, G.D. 1991. Detection of antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* in egg yolk versus serum samples. *J Clin Microbiol* 29:2901-2903.
12. Calnek B.W. 1997. Diseases of poultry. 10 ed. Iowa State University Press.
13. Carli, K.T. and Eyigor, A. 2003. Real-time polymerase Chain reaction for *Mycoplasma gallisepticum* in chicken trachea. *Avian Dis* 47(3):712-717.
14. Chalquest, R.R. 1962. Cultivation of the infectious-synovitis-type pleuropneumonia-like organisms. *Avian Dis* 6:36-43.
15. Charlton, B.R., Bickford, A.A., Chin, R.P. and Walker R.L. 1999. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Mycoplasma gallisepticum* isolates from turkeys from the central valley of California. *J Vet Diagn Invest* 11(5):408-415.
16. Chin, R.P., Daft, B.M., Meteyer, C.U. and Yamamoto, R. 1991. Meningoencephalitis in commercial meat turkeys associated with *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis* 35: 986-993.
17. Clyde, Wa, Jr. 1964. *Mycoplasma* species identification based upon growth inhibition by specific antisera. *J Immunol* Jun;92:958-65.
18. Cummings, T.S., Kleven, S.H. y Brown, J. 1986. Effect of medicated feed on tracheal infection and population of *Mycoplasma gallisepticum* in chickens. *Avian Dis*. Jul-Sep;30(3):580-4.
19. DaMassa, A.J. and Adler H.E. 1975. Growth of *Mycoplasma synoviae* in a medium supplemented with nicotinamide instead of B-nicotinamide adenine dinucleotide. *Avian Dis* 19:544-555.

20. Delaplane, J.R., and Stuart, H.O. 1943. The propagation of a virus in embryonated chicken eggs causing a chronic respiratory disease of chickens. *Am J Vet Res* 4:325-332.

21. Dickinson, E.M. and Hinshaw, W.R. 1938. Treatment of infectious sinusitis of turkeys with argyrols and silver nitrate. *J Am Vet Med Assoc* 93:151-156.

22. Dierks, R.E., Newman, J.A. and Pomeroy, B.S. 1967. Characterization of avian *Mycoplasma*. *Ann NY Acad Sci* 143:170-189.

23. Dodd, S. 1905. Epizootic pneumo-enteritis of the turkey. *J Comp Pathol Ther* 18:239-245.

24. Domermuth, C.H., Gross, W.B. and Dubose, R.T. 1967. Mycoplasmal salpingitis of chickens and turkeys. *Avian Dis* 11:393-398.

25. Ellis, M.N., Eidson, C.S., Brown, J., Fletcher, O.J. and Kleven, S.H. 1981. Serological responses to *Mycoplasma synoviae* in chickens infected with virulent or avirulent strains of Marek's disease virus. *Poult Sci* Jun;60(6):1344-1347.

26. Evans, R.D. and Hafez, Y.S. 1992. Evaluation of a *Mycoplasma gallisepticum* strain exhibiting reduced virulence for prevention and control of poultry mycoplasmosis. *Avian Dis* 36:197-201.

27. Ewing M.L., Cookson K.C., Phillips R.A., Turner K.R. and Kleven S.H. 1998. Experimental infection y transmisibilidad of *Mycoplasma synoviae* with delayed serologic response in chickens. *Avian Dis*. Apr-Jun, 42(2):230-8.

28. Fan, H.H., Kleven, S.H., Jackwood, M.W., Johansson, K.E., Pettersson, B. and Levinson, S. 1995. Species identification of avian *micoplasmas* by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Dis* 39:398-407.

29. Fernández, C., Mattsson, J.G., Bolske, G., Levisohn, S. and Johansson, K.E. 1993. Species-specific oligonucleotide probes complementary to 16S rRNA of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* Res Vet Sci Jul;55(1):130-6.

30. Fletcher O.J., Anderson D.P. and Kleven S.H. 1976. Histology of air sac lesions induced in chickens by contact exposure to *Mycoplasma synoviae*. Vet Pathol 13(4):303-314.

31. Frey, M.L., Hanson, R.P. and Anderson, D.P. 1968. A medium for the isolation of avian micoplasmas. Am J Vet Res 29:2163-2171.

32. Garcia M., Jackwood M.W., Levinsohn S. and Kleven S.H. 1995. Detection of *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, and *M. iowae* by multi-species polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. Avian Diseases 39: 606-616.

33. Garner C.M., Hubbard L.M. and Chakraborti P.R. 2000. *Mycoplasma* detection in cell cultures a comparison of four methods. Br. J Biomedic Sci 57(4):295-301. Oncology Research Laboratory.

34. Gautier-Bouchardon, A.V., Reinhardt, A.K., Kobisch, M. and Kempf, I. 2002. In vitro development of resistance to enrofloxacin, erythromycin, tylosin, tiamulin and oxytetracycline in *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma iowae* and *Mycoplasma synoviae*. Vet Microbiol 88(1):47-58.

35. Grau, O., Laigret, F., Carle, P., Tully, J.G., Rose, D.L., and Bove J.M. Identification of a plant-derived mollicute as a strain of an avian pathogen, *Mycoplasma iowae* and its implications for mollicute taxonomy. Int J Syst Bacteriol. 1991 Oct;41(4):473-8.

36. Higgins, P.A. and Whithear, K.G. 1986. Detection and differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* antibodies in chicken serum using enzyme-linked immunosorbent assay. Avian Dis 30:160-168.

37. Holt, J.G. *et al.*, Bergey's manual of determinative bacteriology. 9 ed. Edit. Williams & Wilkins. USA, 1994. pp. 706-715.

38. Hopkins, S.R. and Yoder, H.W. Jr. 1984. Increased incidence of airsacculitis in broilers infected with *Mycoplasma synoviae* and chicken passaged infectious bronchitis vaccine virus. Avian Dis 28:386-396.

39. Hopkins, S.R. and Yoder, H.W. Jr. 1982. Influence of infectious bronchitis strains and vaccines on the incidence of *Mycoplasma synoviae* airsacculitis. Avian Dis 26:741-752.

40. Hyman H.C., Levinsohn, S., Yogev, D. and Razin, S. 1989. DNA probes for *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*: application in experimentally infected chickens. Vet Microbiol 20:323-338.

41. Jansson, E., Backman, A., Hakkarainen, K., Miettinen, A. and Seniusova, B. 1983. Mycoplasmas and arthritis. Z Rheumatol Nov-Dec;42(6):315-319.

42. Jordan F.T. 1981. *Mycoplasma*-induced arthritis in poultry. Isr J Med Sci Jul;17(7):622-625.

43. Jordan, F.T.W. and Amin, M.M. 1980. A survey of *Mycoplasma* infections in poultry. Res Vet Sci 28:96-100.

44. Karaca, K. and Lam, K.M. 1987. Efficacy of comercial *Mycoplasma gallisepticum* bacterin (MG-Bac) in preventing air sac lesions in chickens. Avian Dis 31:202-203.

45. Kempf, I. 1998. DNA amplification methods for diagnosis and epidemiological investigations of avian mycoplasmosis. Avian Pathol. 27: 7-14.

46. Kerr, K.M. and Olson, N.O. 1967. Cardiac pathology associated with viral and Mycoplasmal arthritis in chickens. Ann NY Acad Sci 143:204-217.

47. Khan, M.I. and Kleven, S.H. 1993. Detection of *Mycoplasma gallisepticum* infection in field samples using a species-specific DNA probe. Avian Dis 37:880-883.

48. Khan, M.I., McMartin, D.A., Yamamoto, Y. and Ortmayer, H.B. 1986. Observations on commercial layers vaccinated with *Mycoplasma gallisepticum* (MG) bacterin on a multiple-age site endemically infected with MG. Avian Dis 30:309-312.
49. Khan, M.I. and Yamamoto, R. 1989. Differentiation of the vaccine F-strain from other strains of *Mycoplasma gallisepticum* by restriction endonuclease analysis. Vet microbial 19:167-174.
50. Kleckner, A.L., 1960. Serotypes of avian pleuropneumonia-like organisms. Am J Vet Res 21:274-280.
51. Kleven, S.H. and Yoder, H.W. Jr. 1989. Mycoplasmosis. In H.G. Purchase, L.H. Arp, C.H. Domermuth, and J.E. Pearson (eds.). A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, 3rd. ed. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, PA, pp. 57-62.
52. Kleven, S.H., and Fletcher, W.O. 1983. Laboratory infection of house sparrows (*Passer domesticus*) with *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. Avian Dis 27: 308-311.
53. Kleven, S.H., Browning, G.F., Bulach, D.M., Ghiocas, E., Morrow, C.J. and Whithear, K.G. 1988. Examination of *Mycoplasma gallisepticum* strains using restriction endonuclease DNA analysis and DNA-DNA hybridisation. Avian Pathol 17:559-570.
54. Kleven, S.H., Fletcher, O.J. and Davis, R.B. 1975. Influence of strain of *Mycoplasma synoviae* and route of infection on development of synovitis or airsacculitis in broilers. Avian Dis 19:126-135.
55. Kleven, S.H., King, D.D. and Anderson, D.P. 1972. Airsacculitis in broilers from *Mycoplasma synoviae*: Effect on air sac lesions of vaccinating with infectious bronchitis and Newcastle virus. Avian Dis 16:915-924.
56. Kume K., Kawakubo Y. and Yoshioka M. 1979. Experimentally induced synovitis of chickens with *Mycoplasma synoviae*: effects of dexamethasone treatment. Am J Vet Res Feb;40(2):280-284.

57. Kume K., Kawakubo Y., Morita C., Hayatsu E. and Yoshioka M. 1977. Experimentally induced synovitis of chickens with *Mycoplasma synoviae*: effects of bursectomy and thymectomy on course of the infection for the first four weeks. Am J Vet Res Oct;38(10):1595-1600.
58. Lam, K.M. 2003. *Mycoplasma gallisepticum*-induced alterations in chicken red blood cells. Avian Dis 47(2):485-488.
59. Levinson, S. and Kleven, S.H. 2000. Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*). Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 19(2):425-442.
60. Ley, D.H., Avakian, A.P. and Berkhoff, J.E. 1993. Clinical *Mycoplasma gallisepticum* infection in multiplier breeder and met turkeys cause by F strain: identification by SDS-PAGE, restriction endonuclease analysis; and the polymerase chain reaction. Avian Dis 37:854-862.
61. Lin, M.Y. and Kleven, S.H. 1982a. Pathogenicity of two strains of *Mycoplasma gallisepticum* in turkeys. Avian Dis 26:360-364.
62. Lin, M.Y. and Kleven, S.H. 1982b. Egg transmission of two strains of *Mycoplasma gallisepticum* in chickens. Avian Dis 26:487-495.
63. Lockaby, S.B., Hoerr, F.J., Kleven, S.H. and Lauerman, L.H. 1999(a). Pathogenicity of *Mycoplasma synoviae* in chicken embryos. Avian Dis. 43(2):331-337.
64. Lockaby, SB, Hoerr FJ, Lauerman LH, Smith BF, Samoylov AM, Toivio-Kinnucan MA and Kleven S.H. 1999(b). Factors associated with virulence of *Mycoplasma synoviae*. Avian Dis. Apr-Jun;43(2):251-61.
65. Markham, F.S. and Wong, S.C. 1952. Pleuropneumonia-like organisms in the etiology of turkey sinusitis and chronic respiratory disease of chickens. Poult Sci 31:902-904.
66. Markham, J.F., Morrow, C.J., Scott, P.C and Whithear, K.G. 1998. Safety of a temperature sensitive clone of MS as a live vaccine. Avian Dis. 42(4) 667-681.

67. Marois, C., Dufour-Gesbert, F. and Kempf, I. 2001. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis with random amplified polymorphic DNA for typing of *Mycoplasma synoviae*. *Vet Microbiol* 2;79 (1):1-9.

68. Marois, C., Dufour-Gesbert, F. and Kempf, I. 2000. Detection of *Mycoplasma synoviae* in poultry environment samples by culture and polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 11;73(4):311-318. Erratum in: (*Vet Microbiol* 2000 Sep 25;76(2):207. Oufour-Gesbert F [corrected to Dufour-Gesbert F].

69. Mc Bride, M.D., Hird, D.W., Carpenter, T.E., Snipes, K.P., Danaye-Elmi, C. and Utterback, W.W. 1991. Health survey of backyard poultry and other avian species located within one mile of commercial California meat-turkey flocks. *Avian Dis* 35:403-407.

70. Mc Martin, D.A., Khan, M.I., Farver, T.B. and Christie, G. 1987. Delineation of the lateral spread of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. *Avian Dis* 31:814-819.

71. Mohammed, H.O., Carpenter, T.E. and Yamamoto, R. 1987. Economic impact of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* in commercial layer flocks. *Avian Dis* 31:477-482.

72. Mohammed, H.O., Carpenter, T.E., Yamamoto, R. and Mc Martin, D.A. 1986. Prevalence of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* in commercial layers in southern and central California. *Avian Dis* 30:519-526.

73. Morrow, C.J., Markham, J.F. and Whithear, K.G. 1998. Production of temperature-sensitive clones of *Mycoplasma synoviae* for evaluation as live vaccines. *Avian Dis* 42(4):667-70.

74. Nelson J.B. 1933. Studies on an uncomplicated coryza of the domestic fowl. II. The relation of the "Bacillary" coryza to that produced by exudates. *J Exp Med* 58:297-304.

75. Nelson, J.B. 1939. Growth of the fowl coryza bodies in tissue culture and in blood agar. *J Exp Med* 69:199-209.

76. Nocard, E. and Roux, E.R. 1898. Le microbe de la peripneumonia. Ann Inst Pasteur Paris 12:240-262.

77. Nonomura, I. and Yoder, H.W. Jr. 1977. Identification of avian micoplasma isolates by the agar gel precipitin test. Avian Dis 21:370-381.

78. Noormohammadi, A.H., Browning, G.F., Jones, J. and Whithear, K.G. 2002. Improved detection of antibodies to *Mycoplasma synoviae* vaccine MS-H using an autologous recombinant MSPB enzyme-linked immunosorbent assay. Avian Pathol 31(6):611-617.

79. Nunoya, T., Yagihashi, T., Tajima, M. and Nagasawa, Y. 1995. Occurrence of keratoconjunctivitis apparently caused by *Mycoplasma gallisepticum* in layer chickens. Vet Pathol 32:11-18.

80. Office International Des Épizooties. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Fifth edition. France, 2004.

81. Olson, N.O. and Kerr, K.M. 1967. The duration and distribution of synovitis-producing agents in chickens. Avian Dis 11:578-585.

82. Olson, N.O., Bletner, J.K., Shelton, D.C., Munro, D.A. and Anderson, G.C. 1954. Enlarged joint condition in poultry caused by an infectious agent. Poult Sci 33:1075.

83. Olson, N.O., Kerr, K.M. and Campbell, A. 1963. Control of infectious synovitis. 12. Preparation of an agglutination test antigen. Avian Dis 7:310-317.

84. Olson, N.O., Kerr, K.M. and Campbell, A. 1964. Control of infectious synovitis. 13. The antigen study of three strains. Avian Dis 8:209-214.

85. Opitz, H.M. 1983. *Mycoplasma synoviae* infection in Maine's egg farms. Avian Dis 27:324-326.

86. Pang, Y., Wang, H., Girshick, T., Xie, Z. and Khan, M.I. 2002. Development and application of a multiplex polymerase chain reaction for avian respiratory agents. *Avian Dis* 46(3):691-699.

87. Papazisi, L., Gorton, T.S., Kutish, G., Markham, P.F., Browning, G.F., Nguyen, D.K., Swartzell, S., Madan, A., Mahairas, G. and Geary, S.J. 2003. The complete genome sequence of the avian pathogen *Mycoplasma gallisepticum* strain R(low). *Microbiology* 149(Pt 9):2307-2316.

88. Papazisi, L., Silbart, L.K., Frasca, S., Rood, D., Liao, X., Gladd, M., Javed, M.A. and Geary, S.J. 2002. A modified live *Mycoplasma gallisepticum* vaccine to protect chickens from respiratory disease. *Vaccine* 20(31-32):3709-3719.

89. Pascucci, S., Maestrini, N., Govoni, S. and Prati, A. 1976. *Mycoplasma synoviae* in the guinea-fowl. *Avian Pathol* 5:291-297.

90. Patten, B.E., Higgins, P.A. and Whithear, K.G. 1984. A urease-ELISA for the detection of *Mycoplasma* infections in poultry. *Aust Vet J* 61:151-155.

91. Poveda, J.B., Carranza, J., Miranda, A., Garrido, A., Hermoso, M., Fernández, A. and Doménech, J. 1990. An epizootiological study of avian *Mycoplasmas* in Southern Spain. *Avian Pathol* 19:627-633.

92. Razin, S. and Freundt, E.A. 1984. The *Mycoplasmas*. In Krieg, N.R. and J.G. Holt (ed). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9th ed., vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 740-793.

93. Razin, S., Yogev, D. and Naot, Y. 1998. Molecular biology and pathogenicity of *Mycoplasmas*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol 62, No. 4, pp. 1094-1156.

94. Rhoades, K.R. 1977. Turkey sinusitis: synergism between *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma meleagridis*. *Avian Dis* Oct-Dec;21(4):670-674.

95. Rhoades, K.R. 1987. Airsacculitis in turkeys exposed to *Mycoplasma synoviae* membranes. Avian Dis 1987 Oct-Dec;31(4):855-860.

96. Sahu S.P. and Olson N.O. 1976. Development of cold agglutinin to chicken red blood cells in *Mycoplasma synoviae* infection. Avian Dis Oct-Dec;20(4):724-727.

97. Salisch, H., Ryll, M., Leise, R. and Neumann, U. 2000. Use of an alkaline phosphatase-labeled probe for the detection of *Mycoplasma synoviae* in chickens. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 47 (1):27-35.

98. Sambrook, J. and Russell, D.W. Molecular Cloning, a laboratory manual.. 3a ed. Edit. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Vol. 2, pp. 8.5. New York, 2001.

99. Shimizu, T., Takahata, T. and Kato, M. 1990. Detecction of serum antibodies against *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* by a dot-immunobinding technique. Nippon JuigakuZasshi Apr;52(2):191-197. Department of Veterinary Hygiene.

100. Silveira, R.M., Fiorentin, L. and Marques, E.K. 1996. Polymerase Chain Reaction optimization for *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* diagnosis. Avian Dis Jan-Mar;40(1):218-22.

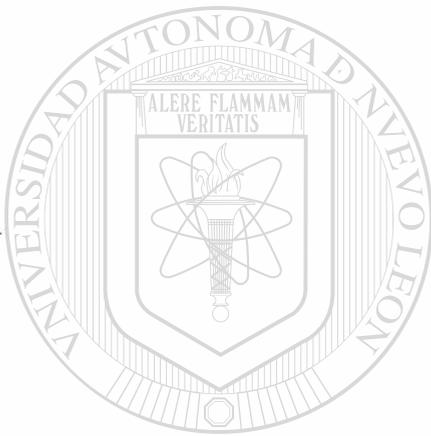
101. Slavik, M.F., Wang, R.F. and Cao, W.W. 1993. Development and evaluation of the polymerase chain reaction method for diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* infection chickens. Mol Cell Probes 7(6):459-463.

102. Talkington, F.D. and Kleven, S.H. 1983. A classification of laboratory strains of avian *Mycoplasma* serotypes by direct immunofluorescence. Avian Dis 27:422-429.

103. Timms, L.M., Marshall, R.N. and Breslin, M.F. 1989. Evaluation of the efficacy of chlortetracycline for the control of chronic respiratory disease caused by *Escherichia coli* and *Mycoplasma gallisepticum*. Res Vet Sci 47:377-382.

104. Tully, J.G. 1995. Culture medium formulation for primary isolation and maintenance of mollicutes. In *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmatology*. Volume 1, Molecular Characterization, Razin S & Tully J.G., eds. Academic Press, New York, USA, and London, UK, 29-32.
105. Valladares, De la Cruz, J.C. 2005. Comunicación personal. Jefe del Laboratorio de Diagnóstico de la Productora de Alimentos Pecuarios, S.A.
106. Van Roekel, H. and Olesiuk, O.M. 1953. The etiology of chronic respiratory disease. Proc 90th Annu Meet Am Vet Med Assoc, pp. 289-303.
107. Van Roekel, H., Gray, J.E., Shipkowitz, N.L., Clarke, M.K. and Luchini, R.M. 1957. Etiology and pathology of the chronic respiratory disease complex in chickens. Univ Mass Agric Exp Stn Bull 486.
108. Walker, E.R., Friedman, M.H., Olson, N.O., Sahu, S.P. and Mengoli, H.F. 1978. An structural study of avian synovium infected with an arthropic *Mycoplasma synoviae*. Vet Phatol May;15(3):407-417.
109. Weinack, O.M., Snoeyenbos, G.H. and Kleven, S.H. 1983. Stain of *Mycoplasma synoviae* of low transmissibility. Avian Dis Oct-Dec;27(4):1151-6.
110. Whithear, K.G., Bowtell, D.D., Ghiocas, E. and Huges, K.L. 1983. Evaluation and use of micro-broth dilution procedure for testing sensitivity of fermentative avian *micoplasmas* to antibiotics. Avian Dis 27:937-949.
111. Whithear, K.G. 1996. Control of avian mycoplasmosis by vaccination. Rev Sci Tech. 15(4):1527-1553.
112. Whithear, K.G., Soeripto, Harringan, K.E. and Ghiocas, E. 1990. Safety of temperature sensitive mutant *Mycoplasma gallisepticum* vaccine Aust Vet J. 67(5):159-165.

113. Yagihashi, T. and Kato, K. 1984. Diversity in nicotinamide-adenine dinucleotide requirement for the growth of different strains of *Mycoplasma synoviae*. Res Vet Sci Nov;37(3):353-354.
114. Yamada, S. and Matsuo, K. 1983. Experimental infection of ducks with *Mycoplasma synoviae*. Avian Dis 27(3):762-765.
115. Yamamoto, R. and Adler, H.E. 1958. Characteristics of pleuropneumonia-like organisms of avian origin. II. Cultural, biochemical, morphological and further serological studies. J Infect Dis 102:243-250.
116. Yoder, H.W. Jr. 1970. Preincubation heat treatment of chicken hatching eggs to inactivate *Mycoplasma*. Avian Dis 14:75-86.
117. Yoder, H.W., Jr. 1975. Production, purification and characterization of avian *Mycoplasmas*. Am J Vet Res 36:560-562.
118. Yoder, H.W., Jr., Drury, L.N. and Hopkins S.R. 1977. Influence of environment on airsacculitis: effects of relative humidity and air temperature on broilers infected with *Mycoplasma synoviae* and infectious bronchitis. Avian Dis 21:195-208.
119. Yoder, H.W., Jr., and Hofstad, M.S. 1964. Characterization of avian *Mycoplasma*. Avian Dis 8:481-512.
120. Yoder, H.W., Jr. and Hopkins, S.R. 1985. Efficacy of experimental inactivated *Mycoplasma gallisepticum* oil emulsion bacterin in egg layer chickens. Avian Dis 29:322-334.
121. Yogev, D., Levisohn, S. and Razin, S. 1989. Genetic and antigenic relatedness between *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. Vet Microbiol 19:75-84.
122. Zhao, S. and Yamamoto, R. 1993. Detection of *Mycoplasma synoviae* by polimerase chain reaction. Avian Pathol 22:533-542.



APÉNDICE A

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



MATERIALES

Reactivos

GIBCOBRL: Agarosa ultrapura (1062319), Agua UPE (1070078).

RESEARCH ORGANICS: Fosfato de potasio monobásico (S39037); Fosfato de potasio dibásico (P29126), Cloruro de potasio y Cloruro de sodio(Lote T41997).

PROQUIMH: Etanol absoluto

MWG: Iniciadores.

PROMEGA: Taq polimerasa en amortiguador B (Lote 142932, 190930),

DNTP's (Lote 134522), PCR DNA Marker (Lote 1394B13).

INVITROGEN: Enzima de restricción *Hpa* I (Lote 121039C), Marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder (Lote 1216293).

SIGMA: Azul de bromofenol (Lote: 37H3708), Bromuro de etidio (68H3640),

Acetato de Talio (Lote 71K1395), Glicerol (Lote 57H0679) Xilencianol (Lote 39H3603).

LAKESIDE: Penprocilina 400,000 U (X20161,X20162).

DIFCO: Medio de cultivo infusión cerebro corazón

BECTON DICKINSON: Base para caldo de Micoplasmas (Lote 3247350).

USBIOLOGICAL: Extracto de levaduras (Lote L1082403M), Agua UPE (CAS 7732-18-5).

DESARROLLO DE ESPECIALIDADES QUÍMICAS: Hidróxido de sodio (HS Lote 970707-01).

JALMEK: Rojo de fenol (Lote 1-0103-13R33).

PRODUCTOS QUÍMICOS MONTERREY: EDTA (Lote 834504)

IVAX: Bencilpenicilina procaínica con bencilpenicilina cristalina (407815).

Controles positivos para PCR-RFLP

Los controles positivos empleados en esta investigación se obtuvieron a partir de 2 productos comerciales: 1) a partir del antígeno para aglutinación en placa, disponible comercialmente para MG y MS cuyo nombre es **Nobilis MG Antigen y Nobilis MS Antigen** respectivamente, de la compañía Exp. **INTERVET** International B.V. (Wim de Korverstraat 35 P.O. Box 31 5830 AA Boxmer Holanda). Este contiene una suspensión de células de *Micoplasma* coloreadas cristal violeta. 2) A partir de las vacunas vivas para MG conteniendo la cepa ts-11 de la marca Merial Select Inc. (Gainesville, GA 30503 USA) con numero de lote MA339 y MS Vax-safe de Avi-mex S.A. de C.V (Maíz 18 México 09810 D.F.) con la cepa MS-H y numero de lote 140502. ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

EQUIPO

GENERICCO: Tubos para cultivo con tapa de rosca de 16 x 180mm.

BIORAD: Cámaras para electroforesis horizontal MINI-SUBCELL GT No. B170-4408 y B179-4483; Fluor-S™ Multimager (423BR0200); Micropipeta de 0.5-10 µl (B166-0505EDU); Fuente de poder PAC200 y 3000 (serie 284BR04555 y 288BR1395); Transiluminador.

CORNING: pHmetro 430 serie 006191.

EPPENDORF: Microcentrífuga modelo 5415C.

EXPLORER: Balanza analítica E11140 SN D007024738.

FELISA: Termoagitador FE-311.

MAYTAG: Congelador de -20°C Admira 2-35583-001.

MISONIX: Estación de PCR.

MJ-RESEARCH INC: Termociclador de placa caliente PTC-100™.

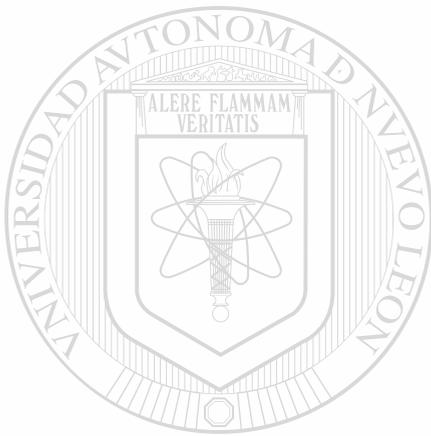
OHAUS: Balanza CT1200 .

WHITE-WESTINGHOUSE: Refrigerador convencional.

Autoclave genérica

SO-LOW: Ultracongelador -40°C

NAPCO: Incubadora de CO²



U A N L
APÉNDICE B

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Recomendaciones generales para obtener mejores resultados:

1. Las soluciones empleadas para extracción de Ácidos nucleicos sean preparadas con H₂O UPE libre de DNAsa y RNAsa.
2. En las soluciones que requieran de esterilización, esta se efectúe correctamente revisando los dispositivos para esto.
3. Emplear las medidas de seguridad básicas para manipular agentes biológicos (bata de manga larga, guantes, gafas y cubrebocas).
4. Usar mecheros al momento de trabajar con muestras biológicas para evitar contaminación entre ellas.
5. Se realicen alícuotas de los reactivos más sensibles a degradación o contaminación, p. ej. los empleados para extracción, PCR y RFLP.
6. Los ácidos nucleicos extraídos y los productos de PCR y RFLP sean mantenidos a temperatura de -20°C y cuando se vayan a usar se transporten o mantengan en hielo para evitar su degradación.

1. Reactivos para cultivo

Caldo de *Mycoplasma*:

Parte A: Para preparar un litro de caldo base para *Mycoplasma* se siguieron las recomendaciones del proveedor Becton Dickinson, el cual recomienda suspender 20g del polvo en 1L de agua. Se empleo agua bidestilada UPE como disolvente.

Parte B: Los ingredientes de la parte B se mezclan y se calientan a 55 C, excepto el fenol rojo.

Suero de cerdo

Se empleo suero de cerdo extraído a partir de sangre completa. La sangre fue filtrada a través de filtros de 0.4µm.

Extracto de levaduras 25%

Disolver 25g de extracto de levaduras con agua bidestilada estéril, aforando a 100ml.

Glucosa 10%

Disolver 10g de glucosa con agua bidestilada estéril, aforando a 100ml.

Acetato de Talio 5%

Disolver 5g de acetato de talio con agua bidestilada estéril, aforando a 100 ml.

Fenol rojo 0.1%

Disolver 0.1g de fenol rojo en 100ml de agua bidestilada estéril.

Hidróxido de sodio 0.1M

Disolver 0.40g de hidróxido de sodio en 100ml de agua bidestilada estéril.

2. Preparación de reactivos para electroforesis en gel de agarosa

Gel de agarosa al 0.8 y 2%:

Agregar 0.8g ó 2g de agarosa según corresponda, a 100ml de TBE1x y calentar en microondas hasta que la agarosa esté líquida y transparente.

Amortiguador TBE 10x pH 8.0:

Disolver 108g de Tris base y 55g de ácido bórico en 900ml de agua desionizada. Agregar 40ml de EDTA 0.5M (pH 8.0) y aforar a 1 litro. Esterilizar y mantener a temperatura ambiente o 4°C.

Amortiguador TBE 1x:

Mezclar 900ml de agua con 100ml de TBE 10x y agitar vigorosamente.

3. Preparación de reactivos para electroforesis en gel de poliacrilamida

Ingredientes del gel de poliacrilamida (10ml)

Bisacrilamida.....	3.2ml
Tris base.....	1.6ml
Agua bidestilada estéril.....	4.7ml
APS.....	196µl
Temed.....	15µl

Solución bis-acrilamida 30%

Disolver 29.2g de acrilamida y 0.8g de bis-acrilamida, aforar a 100ml y filtrar en papel Whatmann #1. Almacenar a temperatura ambiente en frascos ámbar u oscuros.

Persulfato de amonio 10%

Disolver 1g de Persulfato de Amonio en 10ml de agua bidestilada.
Colocar alícuotas de 1ml en tubos para microcentrífuga de 1.5ml y almacenar en congelación hasta su uso.

Amortiguador Tris-base [2M] pH 8.8

Tris-base.....	12.1g
Agua bidestilada.....	35ml
HCl concentrado.....	4ml *

* Aproximadamente , hasta alcanzar el pH de 8.8, luego aforar a 50ml.

Amortiguador de corrimiento 10X

Glicina.....	34.6g
Tris-base.....	7.2g

Aforar a 300ml con agua bidestilada. Para preparar la solución al 1X se mezclan 25ml (10X)+ 250ml de agua bidestilada.

3. Reactivos en general

Medio Infusión Cerebro Corazón (ICC)

Disolver 37g en 1 litro de agua bidestilada, esterilizar en autoclave 15 min a 120°C.

EDTA 0.5M (pH 8.0):

Agregar 186.1g de EDTA a 800ml de agua. Agitar vigorosamente en un agitador magnético. Ajustar el pH a 8.0 con NaOH. Dispensar en alícuotas y esterilizar en autoclave.

PBS 150mM (pH 7.2):

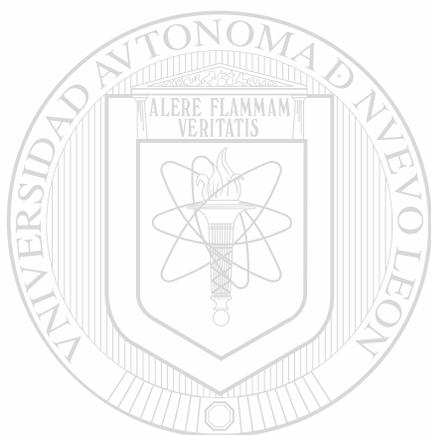
Disolver 0.876g de NaCl, 1.12g de KCl, 2.04g de Na₂HPO₄ y 2.613g de KH₂PO₄ aforando a 100ml de agua desionizada. Ajustar el pH con NaOH. Dispensar en alícuotas y esterilizar en autoclave.

Amortiguador de carga:

Disolver 25 mg de azul de bromofenol, 25 mg de xilencianol y 3 ml de glicerol aforando a 10 ml.

Bromuro de etidio a 0.1%:

Se adicionan 20µl de bromuro de etidio (10mg/ml) en 200ml de agua bidestilada.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

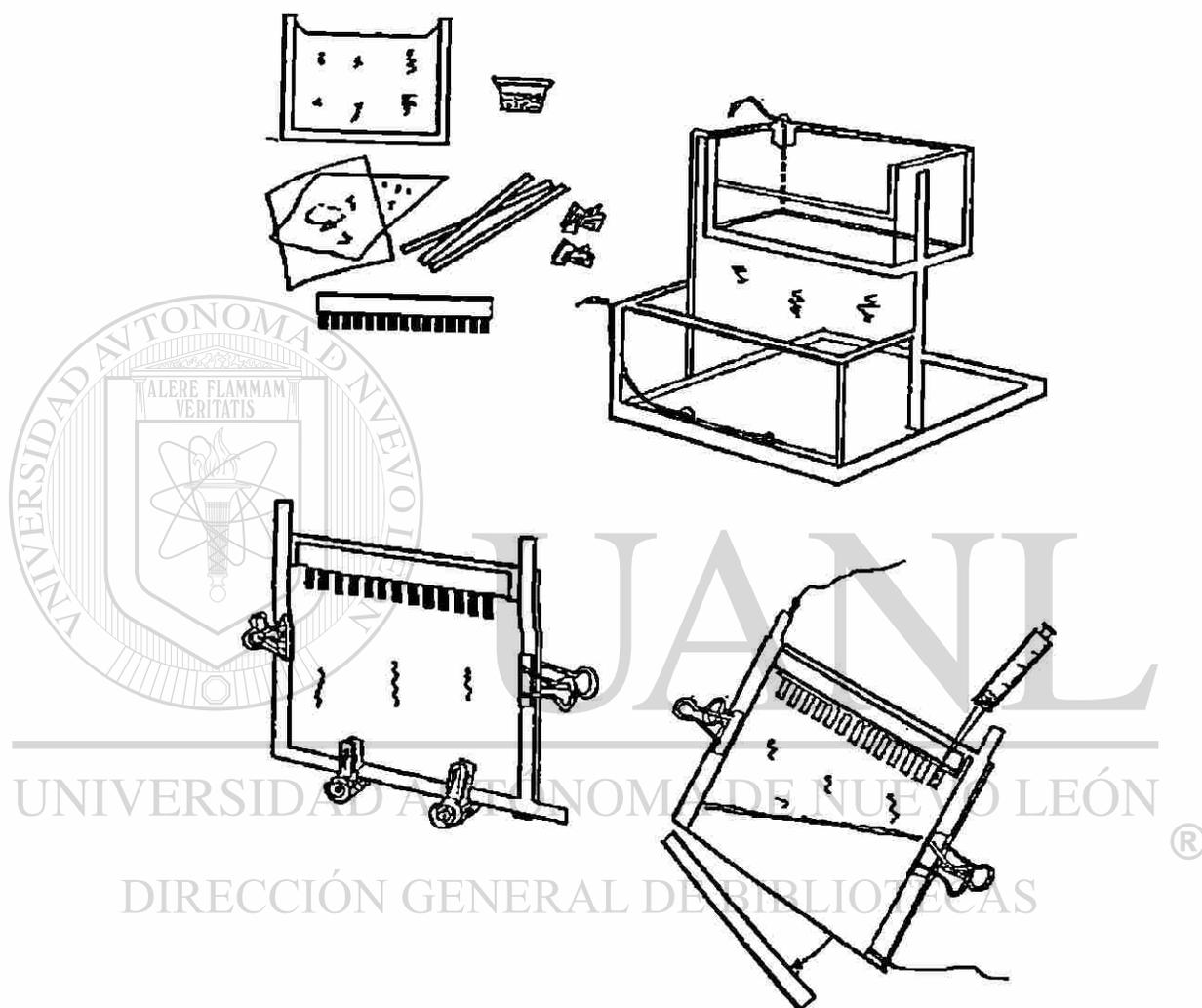


Figura 1. Montaje de vidrios y materiales para preparación de gel de poliacrilamida.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Alicia Guadalupe Marroquín Cardona

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias Veterinarias con especialidad en Salud Animal

Tesis: **IMPLEMENTACIÓN DEL DIAGNÓSTICO DE *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* POR PCR-RFLP EN AVES DE PRODUCCIÓN.**

Campo de Estudio: Salud Animal

Biografía

Datos Personales: Nacida en Guadalupe, Nuevo León el 27 de Noviembre de 1979, hija de Jacinto Marroquín García y Ma. De los Ángeles Cardona Sánchez.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Médico Veterinario Zootecnista en 2002.

Experiencia Profesional

Institución: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Período: 2001 a la fecha.

Puesto: Técnico laboratorista en la Unidad de Investigación Veterinaria en Enfermedades Infecciosas y Genética.

Período: Febrero 2003-Julio 2004

Puesto: Maestro por horas

Ponencias

Presentación de los siguientes trabajos:

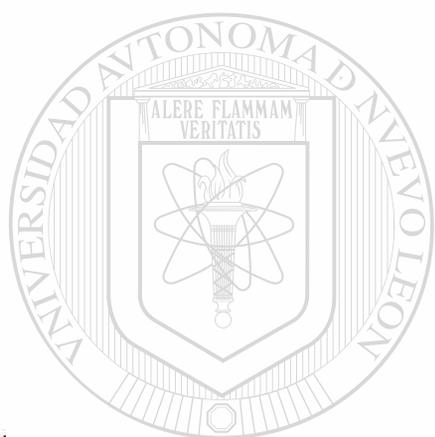
Detección de Anticuerpos contra *Mycoplasma synoviae* por Aglutinación en Placa en Aves de Postura. XIX Congreso Nacional de Investigación Biomédica. Del 22 al 26 de octubre de 2001

Presencia de *Mycoplasma gallisepticum* (MG) en Aves de Postura. XIX Congreso Nacional de Investigación Biomédica. Del 22 al 26 de octubre de 2001

Diagnóstico de *Mycoplasma gallisepticum* en Granjas de Nuevo León Mediante Inmuno-ensayo Ligado a Enzima (ELISA). XX Congreso Nacional de Investigación Biomédica. Del 23 al 25 de octubre del 2002

Detección de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* mediante PCR-RFLP en aves de producción. XXII Congreso Nacional de Investigación Biomédica. Del 20 al 22 de Octubre del 2004

Presentación de avances de tesis del anteproyecto titulado **IMPLEMENTACIÓN DEL DIAGNÓSTICO DE *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* POR PCR-RFLP EN AVES DE PRODUCCIÓN**, en los seminarios correspondientes a los semestres agosto-enero 2003 (27 septiembre al 3 de octubre), agosto-enero 2004 (27 de octubre 2004) y febrero-julio 2005 (26 de mayo 2005), realizados en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



