

## AISLAMIENTO DE MYCOPLASMA SYNOVIAE DE POLLOS PARRILLEROS Y GALLINAS REPRODUCTORAS PRIMERA COMUNICACIÓN EN LA REPÚBLICA ARGENTINA

R. O. Cerdá<sup>1,2</sup>, J. A. Xavier<sup>2</sup>, M. A. Petruccelli<sup>3</sup>, M. E. Etcheverrigaray<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Cátedra de Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias

<sup>2</sup>Laboratorio de Investigaciones y Diagnóstico Bacteriológico

<sup>3</sup>Cátedra de Patología de Aves y Pilíferos, <sup>4</sup>Cátedra de Virología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

**RESUMEN:** En sucesivos muestreos realizados sobre 29 pollos parrilleros y 72 gallinas reproductoras pesadas de 2 establecimientos avícolas de la Provincia de Buenos Aires, se aislaron 23 cepas de *Mycoplasma synoviae* (5 de pollos parrilleros y 18 de gallinas reproductoras pesadas). Los parrilleros presentaban signos clínicos de Sinovitis Infecciosa (SI), mientras que los reproductores manifestaban trastornos respiratorios compatibles con la Enfermedad Respiratoria Crónica de las aves (ERC). En ambas categorías de animales se detectó serología positiva a *Mycoplasma synoviae* (Pruebas de Aglutinación Rápida en Placa e Inhibición de la Hemoaglutinación). La tipificación de las cepas aisladas, se llevó a cabo mediante el estudio de sus propiedades culturales, bioquímicas y serológicas, siendo ésta la primera comunicación de aislamiento de este microorganismo en la República Argentina.

**PALABRAS CLAVES:** Sinovitis infecciosa, *Mycoplasma synoviae*, Aislamiento, Caracterización.

### ISOLATION OF MYCOPLASMA SYNOVIAE FROM BROILER CHICKENS AND BREEDERS. FIRST REPORT IN ARGENTINA

**ABSTRACT:** Twenty three *Mycoplasma synoviae* strains (5 from broiler chickens and 18 from broiler breeders) were isolated from 2 farms of broiler chickens and broiler breeders of Buenos Aires province. The broilers presented symptoms of Infectious Synovitis and the breeders showed clinical signs of Chronic Respiratory Disease. Both categories of animals were serologically positive to *Mycoplasma synoviae* (Rapid Plate Agglutination Test and Hemagglutination Inhibition Test). The isolated strains were characterized as *Mycoplasma synoviae* on the bases of their cultural, biological and serological properties. This is the first report of isolation of this organism in Argentina.

**KEY WORDS:** Infectious Synovitis; *Mycoplasma synoviae*; Isolation, Characterization

## INTRODUCCIÓN

La Micoplasmosis Aviar es una enfermedad ampliamente difundida por todo el mundo, pudiéndose presentar como Enfermedad Respiratoria Crónica (ERC) o como Sinovitis Infecciosa (SI), siendo *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* respectivamente los responsables de las mismas (Olson et al, 1956). Este último organismo está también comprometido en la ERC produciendo trastornos a nivel respiratorio tales como traqueítis, sinusitis, inflamación de sacos aéreos y pulmones (Olson et al, 1964), presentando estas manifestaciones principalmente luego de las vacunaciones contra Enfermedad de Newcastle y Bronquitis Infecciosa (Kleven et al, 1972). A partir de estos órganos puede diseminarse por vía sanguínea y alcanzar las articulaciones y producir artritis y sinovitis (Kleven et al, 1991). Si bien la mortalidad en estas dos formas de presentación es baja, la morbilidad es muy alta, lo cual se traduce en importantes pérdidas económicas producto del bajo incremento de peso en los planteles de pollos parrilleros (Mollison, 1985) y descenso de la postura en las gallinas ponedoras (Mohammed et al, 1987).

En nuestro país existen pocos estudios sobre Micoplasmosis Aviar (Colusi et al., 1962, 1963; Cerdá et al, 1993), pero de mucho valor como antecedentes de la presencia de esta enfermedad en las granjas de nuestro medio rural. Por otro lado, es una preocupación frecuente entre los veterinarios y productores avícolas la detección de esta enfermedad en sus planteles, ya sea mediante la observación de signos clínicos característicos o por los monitoreos serológicos positivos.

Este trabajo tiene como objetivo comunicar los primeros aislamientos en el país de cepas de *M. synoviae* a partir de pollos parrilleros y reproductoras pesadas con lesiones articulares y síntomas respiratorios, así como también la metodología empleada para la caracterización de las mismas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Animales:** Durante un período de 5 meses, se tomaron muestras en dos granjas de la Provincia de Buenos Aires productoras de pollos parrilleros y gallinas reproductoras pesadas. El muestreo abarcó un total de 29 pollos parrilleros (5 correspondientes a la granja I y 24 a la granja II) y 72 gallinas reproductoras pesadas (30 de la granja I y 42 de la granja II). Tanto los parrilleros de la granja I como los de la granja II presentaban una marcada inflamación de las articulaciones y dificultad para ca-

minar al momento de la toma de las muestras. Del mismo modo, las reproductoras de las dos granjas presentaban leves signos respiratorios consistentes en rales y chasquidos, y en algunas de ellas, una escasa descarga mucosa óculonasal.

**Histopatología:** Se extrajeron muestras de tendones de la región de los gastrocnemios, pulmón, hígado, bolsa de Fabricio y riñón de los pollos parrilleros, y muestras de pulmón de las reproductoras, las que fueron fijadas en formol neutro al 10%. Las mismas fueron deshidratadas y embebidas en parafina, cortadas y coloreadas con la técnica convencional de hematoxilina y eosina.

**Serología:** Antes del sacrificio de los animales, se realizaron sangrados por punción cardíaca en los parrilleros y punción de la vena del ala en las reproductoras. Una vez separado el suero, se realizó la prueba de aglutinación rápida en placa (ARP) con antígeno de Intervet (Intervet International B.V. Boxmeer-Holland) para *M. gallisepticum* y *M. synoviae*, y de inhibición de la hemoaglutinación (IH) con antígenos de producción propia siguiendo la técnica descrita por Vardamann et al (1969).

**Muestras bacteriológicas:** Las muestras tomadas consistieron en hisopados traqueales de las reproductoras e hisopados traqueales y de exudado articular de las articulaciones fémorotibiales de los pollos parrilleros. Los hisopos se sembraron en forma directa sobre placas de Petri con medio sólido de Frey adicionado con 12% de suero porcino, y luego se inocularon en tubos con 2 ml de medio líquido de Frey (Frey et al, 1968). A partir de estos tubos, se realizaron 4 diluciones 1:10 para disminuir los contaminantes y las sustancias inhibitorias para los micoplasmas presentes en los tejidos. Tanto las placas como los tubos sembrados se incubaron a 37°C.

**Aislamiento y caracterización:** Los procedimientos para el aislamiento e identificación de cepas fueron descriptos previamente (Cerdá et al., 1993; Koshimizu et al., 1993). En esta oportunidad se logró mejorar el método de aislamiento mediante el agregado, en los tubos con medio líquido, de alícuotas de antisueros producidos contra las especies saprófitas de micoplasmas más comunes en el tracto respiratorio (*M. gallinarum* y *M. gallinaceum*) y que por su rápido crecimiento (24 h) dificultan el desarrollo de *M. synoviae* (4 a 6 días).

Luego de varios días de incubación de los cultivos en medio líquido, se realizaron repiques en medio sólido (medio de Frey con el agregado de agar noble al 0,9%). Las placas se llevaron a incubación a 37°C en cámara húmeda y en aerobiosis hasta la detección, mediante el uso de lupa estereoscópica, de colonias típicas del

género *Mycoplasma*. Las cepas aisladas fueron clonadas tres veces para la obtención de cepas puras, conservándose a -20°C en medio líquido de Frey con 10% de glicerol.

Con las colonias que crecieron sobre las placas sembradas en forma directa, se realizó la prueba de inmunofluorescencia directa a fin de obtener un resultado más rápido.

Pruebas bioquímicas: Sobre las cepas clonadas se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas :

Ensayo de requerimiento de colesterol para diferenciación del género *Acholeplasma*. Esta prueba se llevó a cabo sembrando las cepas aisladas en medio sólido de Frey sin suero.

Fermentación de la glucosa: se realizó mediante la inoculación de 0,2 ml de cada cepa en 2 ml de medio líquido de Frey, el cual contiene una concentración final de glucosa del 1% (pH 7,6).

Hidrólisis de la arginina: se inocularon tubos con medio líquido de Frey con el agregado de L-arginina (0,2 g/100 ml de medio, pH 7,0).

Actividad de la fosfatasa: se comprobó la presencia de esta enzima de acuerdo a la técnica de Bradbury (1983).

Reducción del tetrazolium: se llevó a cabo según la técnica de Erno et al (1973).

Detección de la producción de "film & spot" (Freundt et al, 1983).

Pruebas serológicas:

Prueba de Inhibición del Crecimiento: La misma se llevó a cabo según la técnica descrita por Clyde (1964) en la cual se emplearon sueros anti-*M. gallisepticum*, anti-*M. synoviae*, anti-*M. gallinarum* y anti-*M. gallinaceum* preparados en conejos con cepas de referencia de acuerdo a la técnica descrita por Senterfit (1983). Para la producción de los antisueros se utilizaron conejos californianos de aproximadamente 2 Kg de peso, los cuales fueron inoculados con una suspensión de micoplasmas desarrollados en 1.000 ml de medio líquido de Frey, centrifugados a 12000 rpm y lavados 3 veces con solución "buffer" de fosfato (PBS) pH 7,1. El sedimento fue finalmente resuspendido en 10 ml de PBS y conservado a -30°C hasta el momento de su uso. Para la inmunización se realizó una emulsión de 4 ml de la suspensión de antígeno con igual cantidad de adyuvante completo de Freund procediéndose a la inoculación intramuscular de 0,5 ml de antígeno en cuatro sitios distintos y 0,2 ml intradérmicos en otros cuatro lugares. A los 21 días se realizó una segunda descarga de 0,5 ml de antígeno por vía intramuscular en cuatro sitios. A los 42 días de la primer inoculación se realizó el sangrado de los animales y se midió el título de

anticuerpos de cada suero por medio de la prueba de inhibición del crecimiento, obteniéndose en todos los casos, títulos satisfactorios (halos de inhibición entre 10 y 15 mm). Para el desarrollo de esta prueba, se embebieron discos de papel de filtro estéril con los distintos antisueros. Estos se colocaron en el centro de las placas sembradas con cada una de las cepas aisladas y las de referencia. Luego se incubó durante 3 días a 37°C y se evaluó la presencia de halos de inhibición en torno a los discos de papel.

Prueba de Inmunofluorescencia Directa: Se llevó a cabo mediante el empleo de conjugados de *M. gallisepticum* y *M. synoviae* cedidos gentilmente por el Dr. S.H. Kleven (Department of Avian Medicine, University of Georgia). La misma se realizó según la técnica del "bloque de agar" descrita por DelGiudice y Barile (1983), con las siguientes modificaciones: luego de varios días de incubación de las distintas cepas en placas de agar, se seleccionaron dos zonas con colonias separadas. Sobre éstas se colocaron cilindros de plástico de 15 mm de largo por 13 mm de diámetro, de manera que las colonias quedaran dentro de un pocillo formado por el cilindro y el agar. Se colocaron 2 gotas de cada conjugado en cada pocillo y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Luego se procedió al lavado de las colonias con PBS, se retiraron los cilindros, se levantaron las piezas circulares de agar colocándose sobre un portaobjetos. Por último, se adicionaron algunas gotas de solución de montar (60% de glicerol en PBS) sobre las piezas de agar y se examinaron las colonias con microscopio de epi-fluorescencia.

Cepas de referencia: Para la producción de los sueros hiperinmunes y el control positivo de las distintas pruebas bioquímicas y serológicas, se emplearon las cepas de referencia de *M. gallisepticum* PG-31, *M. synoviae* WVU 1853, *M. gallinarum* PG-16 y *M. gallinaceum* DD, cedidas gentilmente por el National Institute of Animal Health de Tsukuba, Japón.

## RESULTADOS

El estudio histopatológico de las articulaciones mostró una marcada hiperplasia de las vainas sinoviales donde se observó una gran infiltración de heterófilos y una infiltración difusa de linfocitos. En el hígado se observaron múltiples focos de necrosis e infiltración de células linfocitarias. En la bolsa de Fabricio se pudo observar edema interfolicular y despoblamiento medular de los folículos linfocitarios. No se observaron alteraciones significativas en pulmón. En las muestras de pulmón de las reproductoras, se observaron algunas áreas neumónicas

Tabla N°1: Lugar de aislamiento de las cepas de *Mycoplasma synoviae*.

Granja	Animales	N° de cepas aisladas/ N° de muestras	Lugar de aislamiento	
			Tráquea	Articulación
I	Parrilleros	2/5	2	-
	Reproductoras	4/30	4	-
II	Parrilleros	3/24	1	2
	Reproductoras	14/42	14	-

con leve infiltración linfocelular y escasas lesiones granulomatosas.

Del total de las 101 muestras procesadas, se logró el aislamiento de 23 cepas de micoplasmas (5 de pollos parrilleros y 18 de gallinas reproductoras) (Tabla N°1), las cuales se caracterizaron por el lento desarrollo (4 días) de colonias con la típica forma de "huevos fritos". Todas las cepas demostraron requerir medios con suero para su crecimiento, fermentaron la glucosa y no hidrolizaron la arginina. Todas fueron negativas a la prueba de fosfatasa y a la de reducción del tetrazolium, y produjeron "film & spot". Las cepas aisladas fueron inhibidas en su crecimiento por el antisuero anti-*M. synoviae*.

Mediante la técnica de epi-inmunofluorescencia directa se detectó fluorescencia específica en las colonias frente al conjugado anti-*M. synoviae*. Esta técnica permitió detectar colonias de *M. synoviae* entre colonias de otras especies de micoplasma en las placas sembradas en forma directa, con lo cual se obtuvo un diagnóstico rápido (4 días) de la enfermedad.

En el estudio serológico, todos los sueros analizados reaccionaron positivamente frente al antígeno de *M. synoviae* en la prueba de ARP y negativamente a *M. gallisepticum*. En la prueba de IH, el 100% de las muestras fueron negativas a *M. gallisepticum*, mientras que el 80% fueron positivas a *M. synoviae* (Tabla N°2).

Tabla N°2: Resultado de las pruebas serológicas de aglutinación rápida en placa e inhibición de la hemoaglutinación

Granja	Animales	N° de muestras	ARP		IH	
			MG <sup>a</sup> (+/td.)	MS <sup>b</sup> (+/td.)	MG (+/td.)	MS (+/td.)
I	Parrilleros	5	0/5	5/5	0/5	0/5
	Reproductoras	30	0/30	30/30	0/30	24/30
II	Parrilleros	24	0/24	24/24	0/24	16/24
	Reproductoras	42	0/42	42/42	0/42	40/42

a: *Mycoplasma gallisepticum*

b: *Mycoplasma synoviae*

## DISCUSIÓN

Según las características de crecimiento, el tamaño de las colonias y sus propiedades bioquímicas y serológicas, los organismos aislados corresponden a cepas de *M. synoviae*.

El aislamiento de *M. synoviae* a partir de muestras extraídas de articulaciones es, por sí misma, muy dificultosa debido al poco tiempo de viabilidad del microorganismo en estos tejidos (Olson et al., 1984). Por tal motivo es importante destacar el aislamiento de dos cepas de estos sitios, confirmando el tropismo de esta especie de micoplasma por los tejidos articulares.

El empleo de antisueros contra las especies saprofitas de micoplasmas frecuentemente presentes en el tracto respiratorio, según recomendaciones de Kleven (datos no publicados) fue de gran utilidad para inhibir el desarrollo de las mismas y permitir el crecimiento de *M. synoviae*, el cual requiere hasta de una semana o más días para su crecimiento.

Coincidiendo con los estudios de otros investigadores (DelGiudice y Barile, 1983), la técnica de inmunofluorescencia directa confirmó ser un método rápido, sensible, y de fácil realización para la identificación de cepas aisladas a campo, principalmente cuando se trata de cultivos mixtos dado que no es necesario realizar el clonado de las mismas.

Con respecto al estudio serológico y según se detalla en la Tabla N°2, es importante hacer referencia a algunos puntos. En primer lugar destacar la alta prevalencia de animales seropositivos a *M. synoviae* en contraposición a la no detección de positivos a *M. gallisepticum*. Esto se correlaciona con observaciones hechas a campo por numerosos productores y profesionales avícolas. Por otra parte es válido destacar la importancia de la técnica de IH como prueba confirmatoria en el diagnóstico de la Micoplasmosis Aviar debido a su alta especificidad, pero sólo cuando un bajo porcentaje de muestras reaccionan positivamente por ARP (Kleven, 1975). El empleo de esta técnica en animales con brotes agudos puede conducir a diagnósticos equivocados por obtención de resultados "falsos negativos", como se observa en las 5 muestras de parrilleros de la granja I. Por tal motivo, sería recomendable utilizar la técnica de ARP como prueba tamiz para el análisis de un número grande de muestras y confirmar el diagnóstico mediante aislamiento o IH en caso de obtener un bajo número de muestras positivas, o bien repitiendo el estudio en un lapso de 10 A 15 días.

Al igual que en la mayoría de los países de alta producción avícola, tanto la ERC como

la SI están desempeñando un importante papel en las pérdidas de producción en nuestro país. Los brotes de estas enfermedades han ido en aumento desde hace unos años como producto del marcado incremento en la importación de pollitos BB de reposición de los plantales de reproductoras. Esto se debe a que en muchas oportunidades, los controles serológicos que se realizan a la entrada de estos lotes, no llegan a detectar a los animales positivos por falta de sensibilidad de las técnicas empleadas como pudo observarse en este trabajo.

Durante varios años hemos intentado aislar a este microorganismo de diferentes brotes

de ERC y SI pero sin éxito. Mediante la estandarización de las técnicas de aislamiento y el apoyo de laboratorios privados y empresas avícolas se logró aislar e identificar por primera vez en el país cepas de *M. synoviae*.

En trabajos posteriores se realizarán estudios de las cepas aisladas a fin de conocer su grado de virulencia mediante la inoculación de pollos SPF (libres de patógenos específicos), estudios de sensibilidad a distintos antibióticos de uso comercial, y estudios de los perfiles proteicos y de los fragmentos de restricción a fin de obtener datos acerca de la epidemiología de esta enfermedad.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Bradbury, J. Phosphatase activity, en *Methods in Mycoplasmaology*. First edition. Academic Press Inc. New York (USA) Vol. I. 1983 p 363-6
2. Cerdá, R.O.; Copes, J.; Moredo, F.; Villat, C.; Stanchi, N. Aislamiento de *Mycoplasma gallisepticum* a partir de gallos reproductores con síntomas de Enfermedad Respiratoria Crónica (ERC). Resumen de los trabajos científicos presentados al I Congreso Internacional de la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata. Av-137 1993
3. Clyde. *Mycoplasma* species identification based upon growth inhibition by specific antisera. *J Immunol* 1964; 92:958-65
4. Colusi, A.; Capaul, E.; Garbini, J. Enfermedad Crónica Respiratoria (PPO). *Rev Med Vet (Buenos Aires)* 1962; 43, 3:155-63
5. Colusi, A.; Garbini, J. Nueva Comprobación de Enfermedad Crónica Respiratoria (CRD). *Rev Med Vet Buenos Aires* 1962; 43,5:295-301
6. Colusi, A. Estudio Microbiológico de cepas de *Mycoplasma gallisepticum* aisladas en la Argentina. *Rev Med Vet (Buenos Aires)* 1963; 44,1:55-61
7. Delgiudice, R. Barile, M. Immunofluorescence, en *Methods in Mycoplasmaology*. First edition. Academic Press Inc. New York (USA) Vol. I 1983 p 431-9
8. Erno, H. Stipkovits, L. Bovine mycoplasmas: Cultural and biochemical studies. II *Acta Vet. Scand.* 1973; 14:450-63
9. Freundt, E. A. Film and Spot Production, en *Methods in Mycoplasmaology*. First edition. Academic Press Inc. New York (USA) Vol. I 1983 p 373-4
10. Frey, M.c., Hanson, R. P. Anderson, D. P. A medium for the isolation of avian Mycoplasmas. *Am J Vet Res* 1968; 29: 2164-71
11. Kleven, S.; King, D. Anderson, D. Airsacculitis in broilers from *Mycoplasma synoviae*: Effect on airsac lesions of vaccinating with infectious bronchitis and Newcastle virus. *Avian Dis* 1972; 16: 915-24
12. Kleven, S. Antibody response to avian mycoplasmas. *Am J Vet Res* 1975; 36: 563-5
13. Kleven, S.; Rowland, G. Olson, N. *Mycoplasma synoviae* infection, en *Diseases of Poultry*, 9th edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa, (USA) 1991 p 223-31
14. Koshimizu, K.; Saito, T.; Shinozuka, Y.; Tsuchiya, K.; Cerdá, R. Isolation and Identification of *Mycoplasma* strains from various species of wild rodents. *J Vet Med Sci* 1993; 55,2:323-4
15. Mollison, E. MS erodes profit margins. *Poult Dig* 1985; 44: 204-7
16. Mohammed, H. O.; Carpenter, T. E. Yamamoto, R. Economic impact of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in comercial layer flocks. *Avian Dis* 1987; 31: 477-82
17. Olson, N.; Shelton, D.; Bletner, J.; Munro, D.; Anderson, G. Studies of infectious synovitis in chickens. *Am J Vet Res* 1956; 17: 747-54
18. Olson, N.; Adler, H.; Damassa, A.; Corstvet, R. The effect of intranasal exposure to *Mycoplasma synoviae* and infectious bronchitis on development of lesions and agglutinins. *Avian Dis* 1964; 8: 623-31
19. Olson, N. *Mycoplasma synoviae* infection, en *Diseases of Poultry* 8th Ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, (USA) 1984 p 212-20
20. Senterfit, L. Preparation of antigen and antisera, en *Methods in Mycoplasmaology*. First edition. Academic Press Inc. New York (USA) Vol. I 1983 p 401-4
21. Vandarmann, T. H. And Yoder, H.W. Jr. Preparation of *Mycoplasma synoviae* hemagglutinating antigen and its use in the hemagglutination inhibition test. *Avian Dis* 1969; 13: 654-61