

Caracterización de cepas de *Mycoplasma* de origen aviario aisladas en México

PEDRO SOLANA MARTAGÓN

*Lab. de Microbiología Experimental
Departamento de Patología Animal*

Centro Nacional de Investigaciones Pecuarias, S.A.G.

(Recibido para publicación el 17 de febrero de 1965)

La intervención de *Mycoplasma* en la enfermedad respiratoria crónica o micoplasmosis, y en la enfermedad de los sacos aéreos, ha sido ampliamente estudiada (Markham y Wong, 1952; Van Roekel y Olesiuk, 1952; Adler, 1960, y Edward y Kanarek, 1960). Se han aislado de aves con síntomas respiratorios y de aves sanas, cepas de *Mycoplasma* diferentes a la patógena estándar S_6 . Estas cepas tienen una estructura antigénica y capacidad patogénica distinta a la de la cepa anteriormente citada (Yamamoto y Adler, 1958; Chalquest y Fabricant, 1960; Yoder y Hofstad, 1962; Kelton y Van Roekel, 1963). En México, una de las enfermedades de las aves que se diagnostica con mayor frecuencia es la micoplasmosis (C.N.I.P., 1964). Estos diagnósticos son generalmente de tipo clínico, aunque en ocasiones son complementados con reacciones de aglutinación utilizando antígeno S_6 de *Mycoplasma*.

No existe ninguna comunicación acerca de los tipos de *Mycoplasma* que prevalecen en México. En el presente trabajo se describen las características de 15 cepas de *Mycoplasma* de origen aviario aisladas en México.

Materiales y métodos

Se estudiaron las características de 15 cepas de *Mycoplasma*. Estas cepas fueron aisladas de aves (gallinas y pollos) que presentaban síntomas respiratorios y en las que clínicamente

se había hecho el diagnóstico de micoplasmosis. En doce de los trece casos estudiados había aerosaculitis. De las tráqueas y sacos aéreos de estas aves se aislaron las cepas que se designaron con la clave: M_1 , M_2 , M_4 , M_5 , M_6 , M_7 , M_9 , M_{10} , M_{11} , M_{12} , M_{14} , M_{22} , M_{24} , M_{4-25} , M_{11} . La cepa M_1 fue aislada de la tráquea de aves en las que el síntoma principal era una traqueolaringitis muy marcada, pero en las que no había aerosaculitis. Siete de las cepas de *Mycoplasma* fueron aisladas en el Estado de Sonora,¹ seis en el Estado de Jalisco,² y dos en el Distrito Federal.³ Todos los aislamientos fueron hechos en medio sólido de Kelton (Kelton, 1960) y en presencia de 10% de dióxido de carbono. Este medio, así como el medio líquido de Kelton (Kelton, 1960), fueron utilizados para la propagación de las cepas durante el transcurso del trabajo. Dos cepas estándar S_6 y la cepa Iowa 695 se utilizaron como patrón de comparación.⁴

La purificación de las cepas se intentó, por medio de subcultivos seriados, a partir de dos o tres colonias. La morfología colonial se

- 1 Laboratorio de la Asociación de Granjeros del Valle del Yaqui, A.C., Ciudad Obregón, Son.
- 2 Laboratorio de Diagnóstico del Programa Pecuario del Plan Lerma-Chapala-Santiago, en Lagos de Moreno, Jal.
- 3 Laboratorio de Microbiología, Escuela Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia, México, D. F.
- 4 "Una de las cepas S_6 se obtuvo del Dr. Gentry de la Universidad de Pennsylvania y la otra fue aislada por el Dr. Adler en California y obtenida junto con la cepa Iowa 695 a través del Dr. W. Kelton, del NADL, Ames, Iowa.

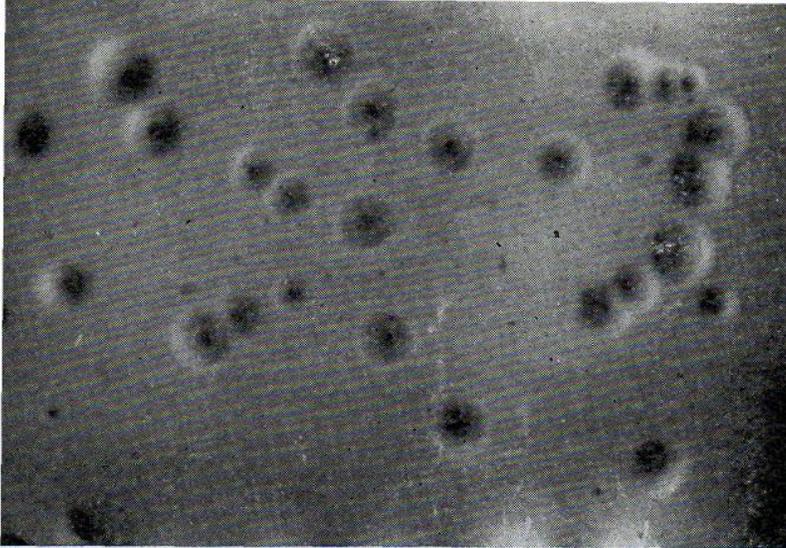


Foto 1.—Colonias de Mycoplasma gallisepticum tipo S₆ aisladas en medio sólido de Kelton. 10 X

estudió por el método de la tinción del agar de Dienes (Adler, 1962) y la morfología celular en frotis hechos a partir de medio líquido y teñidos con colorante diluido de Giemsa. El tiempo de crecimiento se observó en medio sólido. La primera anotación se hizo cuarenta y ocho horas después de haber hecho la siembra y se repitió cada 24 horas en los tres días siguientes. La técnica usada para llevar a cabo la prueba de hemoaglutinación fue la usada por Moore (1960). La prueba de inhibición del crecimiento colonial se hizo de acuerdo con la técnica descrita por Edward y Fitzgerald (1954) y se usó antisuero de la cepa Iowa 695 preparado en conejo. La asimilación de carbohidratos se probó en medio base para fermentación de carbohidratos (Difco) adicionado de 10% de suero de equino; el carbohidrato, acetato de talio en concentración de 1:4000 y 500 U.I. de penicilina por cc. La prueba se repitió cuando menos dos veces para cada cepa.

La patogenicidad para el embrión de pollo se estudió por medio de la inoculación en el saco vitelino de huevos embrionados de siete días de edad de una décima de cc de un cultivo en medio líquido con 48 horas de incubación. El título en este medio líquido fue determinado por el método de Smith (1956).

Los antisueros de cada una de las cepas nativas se produjeron en pollos de ocho semanas de edad que no presentaban anticuerpos contra Mycoplasma S₆ y de los que no había sido posible aislar Mycoplasma antes de ser inoculados. La inoculación se hizo intrasinal-

mente y 15 días después se intentó reaislar las cepas inoculadas a partir de la tráquea y de los sacos aéreos. Las aves fueron sangradas y los sueros, después de inactivados, fueron puestos en contacto con antígeno S₆ de Mycoplasma para realizar pruebas de aglutinación en placa y en tubo.

Se realizaron pruebas de sensibilidad a la Tilosina,⁵ con discos que contenían 30 mg del antibiótico. Estos fueron depositados sobre el medio sólido de Kelton previamente inoculado con 0.1 cc de un cultivo de 48 horas de Mycoplasma.

Resultados y discusión

El crecimiento inicial a partir de una sola muestra, en ocasiones presentó dos tipos de colonias morfológicamente distintas. En dos de las muestras se logró separar estos distintos tipos de colonias.

Las colonias de todas las cepas aisladas pudieron ser teñidas por el método de Dienes presentando el centro de la colonia una coloración más intensa. En algunas cepas como la M₁ se pudo observar que el centro estaba formado por proyecciones irregulares, a diferencia de las demás cepas en las que el centro era liso y compacto.

Los resultados para cada una de las cepas están anotados en el Cuadro 1. El tamaño de

⁵ Los discos- con tartrato de Tilosina se obtuvieron por cortesía de Eli Lilly y Compañía de México, S. A. de C. V., División Elanco.

Cuadro 1. Algunas características de cepas de Mycoplasma de origen aviario aisladas en México

| Cepa No. | Tamaño de la colonia | Crecimiento en medio sólido ^a (horas) | Hemoaglutinación | Inhibición del crecimiento con antisuero Iowa 695 |
|-----------------------|----------------------|--|------------------|---|
| M 1 | G ^b | 48 | + | - |
| M 2 | G | 48 | + | - |
| M 4 | G | 48 | + | - |
| M 5 | G | 48 | + | - |
| M 6 | G | 48 | + | - |
| M 7 | G | 48 | + | - |
| M 9 | G | 48 | + | - |
| M 10 | G | 48 | + | - |
| M 11 | G | 48 | + | - |
| M 12 | G | 48 | + | - |
| M 14 | G | 48 | + | - |
| M 22 | G | 48 | + | - |
| M 24 | P ^c | 96 | + | - |
| M 4-25 | G | 48 | + | - |
| M 11' | G | 48 | - | - |
| Gentry S ₆ | G | 48 | - | - |
| Adler S ₆ | P | 96 | + | - |
| Iowa 695 | G | 48 | + | + |

a) Medio sólido de Kelton

b) G = grande, > .2 mm

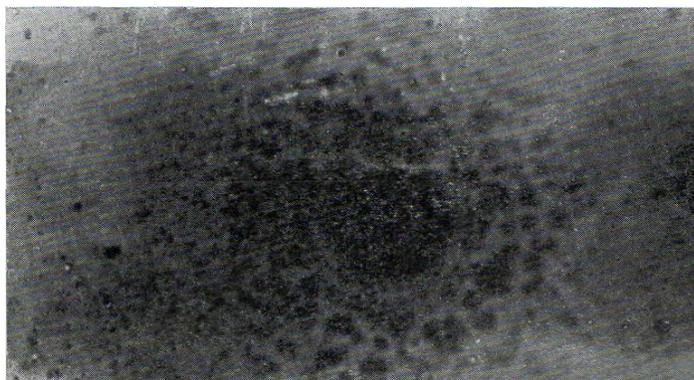
c) P = pequeña, < .2 mm

las colonias se consideró arbitrariamente: como grande si el diámetro de la colonia era de dos o más décimas de milímetro, y pequeño, si menor de esta cifra. En solo una de las cepas nativas, la M₂₄, el crecimiento fue en forma de colonias pequeñas. El tiempo de crecimiento, para 14 de las cepas aisladas y la S₆ de Gentry fue de 48 horas, en cambio para la cepa M₂₄ fue semejante al de la cepa S₆ de Adler, es decir, de tres a cuatro días. La cepa M₄₋₂₅ y M_{11'} no aglutinaron los glóbulos rojos de pollo, las otras 13 cepas pre-

sentaron hemoaglutinación positiva, una de las características de la cepa S₆ de Mycoplasma. La cepa Iowa 695 es capaz de aglutinar glóbulos rojos de pollo, sin embargo, el crecimiento de las cepas probadas no fue inhibido por el antisuero Iowa 695 que sí inhibió el crecimiento de la cepa homóloga.

En el Cuadro 2 se anotan los resultados obtenidos para el título de cada cepa por centímetro cúbico en medio líquido de Kelton y la dosis letal 50% para el embrión (DL₅₀E). La cepa M₄₋₂₅ produjo muertes erráticas de

Foto 2.—Colonia de Mycoplasma **teñida** con el colorante de Dienes. 64 X



los embriones, todas las demás cepas fueron patógenas para el embrión de pollo, variando el título para cada una de ellas. No hubo una relación directa entre los títulos obtenidos en medio líquido y el número de dosis letales cincuenta por ciento para el embrión contenidos en cada cc de líquidos embrionarios, es decir, fue diferente para cada cepa el número de organismos necesarios para formar una DL₅₀E. Estas diferencias pueden ser atribuidas, además de la variación en la virulencia para el embrión, al distinto estado de adaptación de las cepas para crecer en medios artificiales.

La asimilación de dextrosa y sucrosa fue positiva en trece de las cepas estudiadas. Estas cepas dieron resultados negativos con lactosa, galactosa, trealosa, rafinosa, manitol y dulcitol. Las cepas M_{11'} y M_{4.25} no utilizaron los carbohidratos estudiados como fuente de carbono.

La Tilosina a la concentración indicada inhibió el crecimiento de las 15 cepas estudiadas en un área de cuando menos 3 cm de diámetro.

En el cuadro 3 podemos observar que las 15 cepas inoculadas en pollos fueron reaisladas dos semanas después, y trece de ellas estimularon la formación de anticuerpos en contra de la cepa patógena estándar S₆ de

Mycoplasma. Las cepas M₁₁ y M_{4.25}, dieron resultados negativos en esta prueba. Estas dos cepas, aunque aisladas a partir de animales enfermos, pueden ser no patógenas ya que de la misma muestra se aisló Mycoplasma S₆. Cabe también la posibilidad de que hubiera una infección mixta de las dos cepas. El hecho de que en todos los casos en que se aisló Mycoplasma estuvo presente el tipo patógeno S₆ nos da mayor seguridad para usar como complemento en el diagnóstico de la micoplasmosis las reacciones de aglutinación con antígeno S₆ de Mycoplasma.

De los resultados obtenidos podemos concluir que 13 de las cepas estudiadas pertenecen al tipo S₆ de Mycoplasma; mayor número de pruebas se hacen necesarias para la caracterización de las cepas M_{4.25} y M₁₁, de Mycoplasma.

Resumen

Se estudiaron quince cepas de Mycoplasma aisladas de aves que presentaban síntomas respiratorios y que provenían de tres distintas áreas geográficas de México. La clasificación de estas cepas se basó en sus características de crecimiento en medio sólido y líquido, morfología celular, habilidad de asimilación de carbohidratos, patogenicidad para

Cuadro 2. Títulos obtenidos en el medio líquido de Kelton y DL₅₀E de cepas de Mycoplasma

| Cepa No. | Título por cc en medio líquido de Kelton | DL ₅₀ E |
|----------|--|--------------------|
| M 1 | 12 x 10 ⁷ | 10 ³ |
| M 2 | 7 x 10 ⁶ | 10 ¹ |
| M 3 | 7 x 10 ⁶ | 10 ³ |
| M 4 | 14 x 10 ⁶ | 10 ^{2.5} |
| M 5 | 26 x 10 ⁷ | 10 ^{3.1} |
| M 7 | 30 x 10 ⁷ | 10 ³ |
| M 9 | 12 x 10 ⁶ | 10 ² |
| M 10 | 20 x 10 ⁷ | 10 ³ |
| M 11 | 10 x 10 ⁶ | 10 ² |
| M 12 | 15 x 10 ⁷ | 10 ^{3.5} |
| M 14 | 10 x 10 ⁵ | 10 ² |
| M 22 | 12 x 10 ⁶ | 10 ^{2.5} |
| M 24 | 20 x 10 ⁵ | 10 ³ |
| M 4.25 | 15 x 10 ⁶ | muertes erráticas |
| M 11' | 40 x 10 ⁶ | 10 ² |

Cuadro 3. Resultados de las reacciones de aglutinación con antígeno S₆ de Mycoplasma y antisueros de cepas nativas de Mycoplasma

| Ave inoculada con cepa ^a | Reaislamiento de Mycoplasma de tráquea | Aglutinación con antígeno S ₆ de Mycoplasma ^b |
|-------------------------------------|--|---|
| M 1 | + | + |
| M 2 | + | + |
| M 4 | + | + |
| M 4-25 | + | - |
| M 5 | + | + |
| M 6 | + | + |
| M 7 | + | + |
| M 9 | + | + |
| M 10 | + | + |
| M 11 | + | + |
| M 11' | + | - |
| M 12 | + | + |
| M 22 | + | + |
| M 14 | + | + |
| M 24 | + | + |

a) Aves sin anticuerpos contra Mycoplasma y cultivo para aislamiento de Mycoplasma negativo al ser inoculada
b) Prueba efectuada 15 días después de inoculadas las aves.

el embrión de pollo, hemoaglutinación, pruebas de inhibición del crecimiento colonial y pruebas de aglutinación en placa y en tubo usando antígenos específicos. Se estudió también su sensibilidad *in vitro* a la Tilosina.

Trece de las cepas estudiadas fueron clasificadas como *Mycoplasma gallisepticum* tipo S₆.

Literatura citada

- ADLER, H. E., 1960. Mycoplasma, the cause of chronic respiratory disease. Ann N. Y. Acad. Sci., 79:703-712.
- ADLER, H. E., 1962. Chronic respiratory disease in broilers. Aust. Vet. Jour. 38:408-414.
- C. N. I. P., 1964. Informe Anual del Centro Nacional de Investigaciones Pecuarias, 1963-1964, 76, 97.
- CHALQUEST, R. R. y J. FABRICANT, 1954. Inhibition of growth of PPLO by antibody. J. Pathol. Bact. 68:23.
- EDWARD, D. G. y A. D. KANAREK, 1960. Organisms of the pleuropneumonia group of avian origin. Their classification into species. Ann. N. Y. Acad. Sci. 79:696-702.
- KELTON, W. H., 1960. Growth curve studies of pleuropneumonia-like organisms. Ann. N. Y. Acad. of Sci. 79:423-428.
- KELTON, W. H. y H. VAN ROEKEL, 1963. Serological Studies of Mycoplasma (PPLO) of avian origin. Avian Diseases VII, 273-286.
- MARKHAM, F. S. y S. C. WONG, 1952. Observations on pleuropneumonia-like organisms in chronic respiratory disease of chickens and turkey sinusitis. Poult. Sci. 31:926-934.
- MOORE, R. W., L. C. GRUMBLES, J. N. BEARLEY. Pathological, serological, and cultural characteristics of the avian strains of pleuropneumonia-like organisms. Ann. of the New York Acad. of Sci. 79:556-61.

SMITH, P. F. 1956. Quantitative measurement of growth of pleuropneumonia-like organisms. *Appl. Mic.* 4:254-259.

VAN ROEKEL, H. y O. M. OLESIUK, 1962. Chronic respiratory disease of chickens. *Proc. Book, A.V.M.A.* 271-275.

YAMAMOTO, R. y H. E. ADLER, 1958. Characterization of pleuropneumonia-like organisms of avian origin. II Cultural, biochemical, morphological and further serological studies. *Jour. Inf. Dis.* 102:243-250.

YODER, H. W., y M. S. HOFSTAD, 1962. A previously unreported serotype of avian *Mycoplasma*. *Avian Dis.*, 6:147-160.

IN MEMORIAM
Dr. Fernando Camargo

1906 - 1965

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE MYCOPLASMA DE ORIGEN AVIARIO AISLADAS EN MÉXICO

Se describen las características de quince cepas de *Mycoplasma* aisladas en México de aves que presentaban síntomas respiratorios. La clasificación de estas cepas se basó en sus características de crecimiento en medio sólido y líquido, morfología celular, habilidad de asimilación de carbohidratos, patogenicidad para el embrión de pollo, hemoaglutinación, pruebas de inhibición del crecimiento colonial y pruebas de aglutinación en placa y tubo usando antígenos específicos. Se estudió también su sensibilidad *in vitro* a la Tilosina. Trece de las cepas estudiadas fueron clasificadas como *Mycoplasma gallisepticum* tipo S₆; las características de dos de las cepas no corresponden con las de S₆ de *Mycoplasma*.

P. SOLANA, Centro Nacional de Investigaciones Pecuarías, S.A.G., México, D. F.

Téc. Pec. en México, 5:15-20 (1965)

CARACTÉRISTIQUES DE MYCOPLASMA D'ORIGINE AVICOLES ISOLÉ A MÉXICO

On décrit les caractéristiques de quinze *Mycoplasma* isolés à México, de volailles qui présentaient des symptômes respiratoires. La classification de ces *Mycoplasma* fut basée dans ses caractéristiques de croisement en milieu solide et liquide, morphologie cellulaire, aptitude à l'assimilation de carbohydrates, pathogénie pour l'embryon de poulet, hémagglutination, preuve d'inhibition dans le croisement colonial et preuves d'agglutination en plaque et tube utilisant les antigènes spécifiques, Il fut étudié aussi leurs sensibilités *in vitro* à la Tilocine. Treize des sujets étudiés furent classifiés comme *Mycoplasma gallisepticum* type S₆; les caractéristiques des deux autres ne correspondent pas au S₆ de *Mycoplasma*.

P. SOLANA, Centro Nacional de Investigaciones Pecuarías, S.A.G., México, D. F.

Téc. Pec en México, 5:15-20 (1965)

IDENTIFICATION OF MYCOPLASMA ISOLATES OF AVIAN ORIGIN ISOLATED IN MEXICO

The characteristics of 15 Mexican isolates of *Mycoplasma* are described. The isolates were obtained from birds presenting respiratory symptoms. The classification was based on: growth characteristics in solid and liquid media, cellular morphology, ability for carbohydrate assimilation pathogenicity for the chicken embryo, haemoagglutination, colonial growth inhibition trials, and plate and tube agglutination tests. Their sensibility *in vitro* to Tylocine was also studied. Thirteen of the strains were classified as *Mycoplasma gallisepticum* type S₆.

P. SOLANA, Centro Nacional de Investigaciones Pecuarías, S.A.G., México, D. F.

Téc. Pec. en México, 5:15-20 (1965)

CHARAKTERISIERUNG DER IN MEXIKO VON GEFLUEGEL ISOLIERTEN MYCOPLASMA STAEMME

Es werden die Eigenschaften von 15 *Mycoplasma* Staemmen beschrieben, die in Mexiko von Gefluegel mit Symptomen der Atmungsorgane isoliert worden sind. Die Klassifizierung dieser Staemmen basiert sich auf: Wachstumseigenschaften, auf festen und fluessigen Naehrboeden, Zellmorphologie, Faehigkeit der Karbohydratassimilation, Pathogenitaet fuer den Huehnerembryo, Haemagglutination, Inhibitionsproben des Koloniewachstums und Agglutinationsproben auf Platte und im Roehrchen, wobei spezifische Antigene benutzt wurden. Es wurde auch die *in vitro* Empfindlichkeit gegen Tilocina festgestellt. Dreizehn der studierten Staemmen wurden als *Mycoplasma gallisepticum* Typ S₆ klassifiziert, waehrend die weiteren zwei Staemmen nicht den Charakteristiken des Stammes S₆ entsprachen.

P. SOLANA, Centro Nacional de Investigaciones Pecuarías, S.A.G., México, D. F.

Téc. Pec en México, 5:15-20 (1965)