



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Diferenciación molecular de cepas de campo  
y vacunales de *Mycoplasma gallisepticum* y  
*Mycoplasma synoviae* en ponedoras  
comerciales y reproductoras pesadas de la  
zona centro de Colombia**

**Cesar Enrique Ventura Politte**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
Maestría en Salud Animal  
Bogotá, Colombia

2013

# **Diferenciación molecular de cepas de campo y vacunales de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* en ponedoras comerciales y reproductoras pesadas de la zona centro de Colombia**

**Cesar Enrique Ventura Politte**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Salud Animal**

Director :  
Víctor Julio Vera Alfonso, PhD

Línea de Investigación:  
Microbiología y Epidemiología Aviar  
Grupo de Investigación:  
Grupo de Virología veterinaria

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
Maestría en Salud Animal  
Bogotá, Colombia  
2013

*Con mucho amor a Eliana,  
Gabriela y Catalina por  
brindarme todo su apoyo y  
amor todo el tiempo a lo largo  
de este camino.*

*Lo importante en ciencia no es tanto  
obtener nuevos hechos como descubrir  
nuevas formas de pensar sobre ellos.*

*William Lawrence Bragg*



## **Agradecimientos**

A mi familia.

A Rita y mis compañeros de clase y del grupo de investigación, mis nuevos amigos y amigas de la vida, quienes me permitieron entrar en sus vidas y de los que aprendí mucho y con los cuales disfrute de mis ratos de esparcimiento académico.

A los profesores del grupo de investigación por su acompañamiento y apoyo

A la familia Carrillo Ballesteros y Avícola Valle de Tenza Ltda. por su apoyo incondicional

A Colciencias

A mis colegas

A AMEVEA



## Resumen

El presente estudio estableció la presencia de *Mycoplasma gallisepticum* (MG) en un 48.2 % y *Mycoplasma synoviae* (MS) en un 69.9 % en granjas de ponedoras comerciales (GPC) y granjas de reproductoras pesadas (GRP) del centro de Colombia a partir de 193 muestras de hisopos traqueales mediante la técnica de PCR usando los genes *mgc2* y *vlhA* respectivamente. De igual forma se determinaron infecciones mixtas de MG y MS en un 43.5 % de los casos. Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre la presencia de Mycoplasma y los tipos de explotación y factores zootécnicos. Igualmente se realizó la prueba RFLP que permitió determinar dos patrones en 93 muestras positivas por PCR del gen *mgc2* de MG: un patrón de cepa F en un 39.8 % y un patrón de cepa de campo en un 60.2 % sin encontrarse diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre el uso de vacunas de MG y los patrones encontrados. El mayor porcentaje del patrón 2 se encontró en aves alojadas en piso en las GPC.

Se secuenciaron 34 amplificadores de MG y se confirmaron los patrones de cepa vacunal y cepa de campo obtenidos mediante la RFLP. A partir de la secuenciación de una porción del gen hipervariable *vlhA* de MS, se confirmó la gran diversidad de cepas de MS que se encuentran circulando en las GPC y GRP de la zona centro del país, así como la presencia de infecciones por dos cepas de MS en un mismo lote.

**Palabras clave:** *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *mgc2*, *vlhA*, PCR, RFLP, Secuenciación ADN.

## Abstract

The presence of *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and *Mycoplasma synoviae* (MS) was established by PCR of *mgc2* and *vlhA* genes respectively, in layer and breeder farms located in the central area of Colombia. From a total of 193 tracheal swabs samples, 48.2 % were MG positive, 69.9 % were MS positive and 43.5 % corresponded to MG and MS mixed infections. Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) were found when Mycoplasma results were compared against the type of farms and zootechnical parameters. Two patterns were defined in 93 samples analyzed by PCR-RFLP of the MG *mgc2* gene: the strain F pattern was observed in 39.8 % and the field pattern was found in 60.2 % of the samples. No statistical differences were found between the observed pattern and the type of MG vaccine used. Sequencing analysis of 34 MG positive samples confirmed the two RFLP patterns. Gene sequencing analysis of the hypervariable *vlhA* region showed a great number of MS strains. Mixed infection by two strains of MS was confirmed in samples from a flock in GPC and GRP. These results confirm MS variability in the farms at the central zone of Colombia.

**Keywords:** *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *mgc2*, *vlhA*, PCR, RFLP, Sequencing



# Contenido

	Pág.
<b>Resumen y Abstract .....</b>	<b>VII</b>
<b>Lista de figuras.....</b>	<b>XII</b>
<b>Lista de tablas .....</b>	<b>XIII</b>
<b>Lista de Símbolos y abreviaturas .....</b>	<b>XIV</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Micoplasmosis Aviar .....</b>	<b>5</b>
1.1 Introducción.....	5
1.2 <i>Mycoplasma gallisepticum</i> y <i>Mycoplasma synoviae</i> .....	6
1.2.1 Epidemiología.....	6
1.2.2 Patogenicidad.....	8
1.2.3 Diagnóstico.....	9
1.2.4 Diagnóstico molecular .....	11
1.2.5 Control.....	12
1.3 Conclusiones.....	14
<b>Bibliografía .....</b>	<b>15</b>
<b>2. Detección de <i>Mycoplasma gallisepticum</i> y <i>Mycoplasma synoviae</i> mediante la técnica de PCR a partir de hisopos traqueales.....</b>	<b>23</b>
2.1 Resumen.....	23
2.2 Abstract .....	24
2.3 Introducción.....	24
2.4 Materiales y Métodos .....	26
2.4.1 Granjas y aves seleccionadas.....	26
2.4.2 Muestras del estudio .....	26
2.4.3 Extracción de ADN .....	27
2.4.4 Protocolo de amplificación de <i>M. gallisepticum</i> .....	27
2.4.5 Protocolo de amplificación para <i>M. synoviae</i> .....	28
2.4.6 Controles de la prueba .....	29
2.4.7 Control de la extracción del ADN .....	29
2.4.8 Ensayos de sensibilidad y especificidad de las pruebas.....	30
2.4.9 Lectura de la prueba .....	30
2.4.10 Análisis Estadístico .....	31

X	Diferenciación molecular de cepas de campo y vacunales de <i>Mycoplasma gallisepticum</i> y <i>Mycoplasma synoviae</i> en ponedoras comerciales y reproductoras pesadas de la zona centro de Colombia	
---	---	--

2.5	Resultados .....	31
2.6	Discusión .....	40
2.7	Recomendaciones .....	42

**Bibliografía .....44**

**3. Diferenciación molecular por PCR-RFLP de *Mycoplasma gallisepticum* obtenido de hisopos traqueales.....47**

3.1	Resumen.....	47
3.2	Abstract.....	48
3.3	Introducción .....	49
3.4	Materiales y métodos.....	50
3.4.1	Ensayos virtuales .....	50
3.4.2	Muestras de estudio.....	50
3.4.3	Protocolo de amplificación de <i>M. gallisepticum</i> .....	51
3.4.4	Protocolo de la digestión enzimática – RFLP.....	51
3.4.5	Lectura de la prueba en gel de agarosa .....	533
3.4.6	Lectura de la prueba en gel de poliacrilamida .....	533
3.4.7	Procedimiento de tinción de plata.....	533
3.4.8	Análisis Estadístico .....	54
3.5	Resultados .....	54
3.5.1	Resultados en Agarosa al 1,5 %.....	56
3.5.2	Resultados en Agarosa al 2,5 %.....	57
3.6	Discusión .....	57
3.7	Recomendaciones .....	61

**Bibliografía .....62**

**4. Análisis molecular de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* provenientes de granjas de reproductoras y ponedoras comerciales de la zona centro de Colombia .....65**

4.1	Resumen.....	65
4.2	Abstract.....	66
4.3	Introducción .....	66
4.4	Materiales y Métodos.....	67
4.4.1	Protocolo de amplificación de <i>M. gallisepticum</i> .....	67
4.4.2	Protocolo de amplificación para <i>M. synoviae</i> .....	68
4.4.3	Lectura de la prueba .....	69
4.4.4	Purificación de productos de PCR .....	69
4.4.5	Purificación de productos de PCR a partir de gel de agarosa .....	69
4.5	Resultados .....	70
4.5.1	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> .....	70
4.5.2	<i>Mycoplasma synoviae</i> .....	72
4.6	Discusión .....	74
4.7	Recomendaciones .....	76

**Bibliografía .....77**

**5. Conclusiones y recomendaciones.....79**

5.1	Conclusiones .....	79
-----	--------------------	----

---

5.2	Recomendaciones .....	80
<b>A.</b>	<b>Anexo: Preparación de Reactivos.....</b>	<b>83</b>
<b>B.</b>	<b>Anexo: Relaciones Filogenéticas de secuencias de MG y MS.....</b>	<b>85</b>
	<b>Bibliografía .....</b>	<b>89</b>

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 2-1:</b> Amplificados de <i>mgc2</i> . Líneas: 1. MP Flecha 300 pb; 2. CP; 3. CN 4. a 20. MC .....	31
<b>Figura 2-2:</b> Amplificados de <i>vlhA</i> MS1. Líneas: 1. MP Flecha 300 pb; 2. CP; 3. CN; 4 a 20. MC .....	32
<b>Figura 2-3:</b> Amplificados de <i>vlhA</i> MS2. Líneas: 1. MP Flecha: 500 pb; 2. CP; 3. CN; 4. a 20. MC .....	32
<b>Figura 2-4:</b> Amplificados de 28S <i>Gallus gallus</i> Líneas: 1. MP Flecha 100 pb; 2 a 6. MC; 7. CN; 8. CP .....	33
<b>Figura 2-5:</b> Controles de MG. Líneas: 1. MP Flecha 300 pb; 2. Cepa F de 300 pb; 3. Cepa 6/85 de 237 pb. ....	33
<b>Figura 2-6:</b> Positividad a MG y MS del muestreo total.....	34
<b>Figura 2-7:</b> Sensibilidad relativa del control MG Cepa F. Líneas: 1. MP Flecha 300 pb; 2. Puro 3. $10^{-1}$ ; 4. $10^{-2}$ ; 5. $10^{-3}$ ; 6. $10^{-4}$ ; 7. $10^{-5}$ ; 8. $10^{-6}$ ; 9. $10^{-7}$ ; 10. $10^{-8}$ ; 11. $10^{-9}$ ; 12. CN.....	34
<b>Figura 2-8:</b> Sensibilidad relativa del control MG Cepa 6/85. Líneas: 1. MP Flecha 200 pb; 2. CN; 3. Puro; 4. $10^{-1}$ ; 5. $10^{-2}$ ; 6. $10^{-3}$ ; 7. $10^{-4}$ ; 8. $10^{-5}$ ; 9. $10^{-6}$ ; 10. $10^{-7}$ ; 11. $10^{-8}$ ; 12. $10^{-9}$ .	35
<b>Figura 2-9:</b> Sensibilidad relativa del control MS Cepa WVU1853. Líneas: 1. MP Flecha 300 pb; 2. CN; 3. Puro; 4. $10^{-1}$ ; 5. $10^{-2}$ ; 6. $10^{-3}$ ; 7. $10^{-4}$ ; 8. $10^{-5}$ 9. $10^{-6}$ ; 10. $10^{-7}$ ; 11. $10^{-8}$ .....	35
<b>Figura 3-1:</b> RFLP de MG en Agarosa 1,5 %. Líneas: 1. MP ; 2. CN; 3. Patrón Cepa F; 4. Patrón Cepa 6/85; 5. MC; 6. MC; 7. Cepa F sin digestión; 8. MC; 9. MC; 10. MC; 11. MC .....	566
<b>Figura 3-2:</b> RFLP de MG en Agarosa 2,5 % Líneas: 1. MP de 100 pb ; 2. MP de 20 pb; 3. Patrón Cepa F; 4. Patrón Cepa 6/85; 5. MC Patrón 1; 6. MC Patrón 1; 7. MC Patrón 1; 8. MC Patrón 2.....	57
<b>Figura 3-3:</b> RFLP de MG en Poliacrilamida al 15 %. Líneas: 1. MP de 100 pb; 2. MP de 20 pb; 3. Patrón 1 Cepa F; 4. Patrón Cepa 6/85; 5. MC Patrón 1 Cepa F; 6. MC Patrón 1 Cepa F; 7. MC Patrón 2 cepa de campo. ....	58
<b>Figura 4-1:</b> Amplificados de MS en Agarosa 1,5 % Líneas: 1. Flecha MP de 300 pb ; 2. CP; 3. CN; 4. Doble banda (DB) 5. DB; 6. Banda única (BU); 7. DB; 8. BU; 9. DB; 10. a 16. BU .....	74

## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 2-1:</b> Primers utilizados en las PCR de MG y MS .....	28
<b>Tabla 2-2:</b> Primers de <i>Gallus gallus</i> usados como <i>housekeeping</i> celular .....	29
<b>Tabla 2-3:</b> Concentración de ADN de controles de MG y MS .....	30
Tabla 2-4: Distribución de la positividad a MG y MS por tipo de explotación .....	36
Tabla 2-5: Distribución de positividad a MG por número de lotes en GPC.....	37
<b>Tabla 2-6:</b> Distribución de positividad a MG y MS por raza en GPC.....	37
<b>Tabla 2-7:</b> Distribución de positividad a MG y MS por raza en GRP.....	38
<b>Tabla 2-8:</b> Distribución de la positividad a MG y MS en GRP por tipo de instalación .....	38
<b>Tabla 2-9:</b> Distribución de la positividad a MG y MS en GPC por grupo etéreo .....	39
<b>Tabla 2-10:</b> Distribución de la positividad a MG y MS en GRP por grupo etéreo .....	39
<b>Tabla 2-11:</b> Distribución de positividad mixta en GPC y GRP por grupo etéreo .....	39
<b>Tabla 3-1:</b> Sitios teóricos de corte de <i>HaeIII</i> en vacuna Cepa F, vacuna Cepa 6/85 y Cepa R de MG .....	52
<b>Tabla 3-2:</b> Primers de <i>mgc2</i> de MG.....	522
Tabla 3-3: Distribución de patrones de restricción por departamento .....	544
<b>Tabla 3-4:</b> Distribución de patrones de restricción por tipo de explotación .....	555
Tabla 3-5: Distribución de patrones de restricción por raza en GPC.....	555
Tabla 3-6: Distribución de patrones de restricción por tipo de instalación en GPC .....	566
Tabla 4-1: Primers utilizados en las PCR de MG y MS .....	68
Tabla 4-2: Porcentaje de identidad de muestras de campo con el patrón RFLP Cepa F. 71	
<b>Tabla 4-3:</b> Porcentajes de identidad de muestras de campo con el patrón RFLP cepa R 72	
<b>Tabla 4-4:</b> Porcentajes de identidad de muestras de MS purificados de productos de PCR con cepas de referencia.....	73
<b>Tabla 4-5:</b> Porcentaje de similaridad de cepas de MS purificados a partir de gel con cepas de referencia. ....	74

# Lista de Símbolos y abreviaturas

## Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
$\mu M$	<i>Micromolar</i>	<i>Moles/m<sup>3</sup></i>	<i>10<sup>-6</sup> molar</i>
<i>fg</i>	<i>Femtogramo</i>	<i>Masa</i>	<i>10<sup>-15</sup> de gramo</i>
<i>ml</i>	<i>Mililitro</i>	<i>Volumen</i>	<i>10<sup>-3</sup> de litro</i>
<i>mM</i>	<i>Milimolar</i>	<i>Moles/m<sup>3</sup></i>	<i>10<sup>-3</sup> molar</i>
<i>ng</i>	<i>Nanogramo</i>	<i>Masa</i>	<i>10<sup>-9</sup> de gramo</i>
<i>V</i>	<i>Voltios</i>	<i>De flujo</i>	<i>V=J/C</i>
$\mu l$	<i>Microlitro</i>	<i>Volumen</i>	<i>10<sup>-6</sup> de litro</i>

## Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>BU</i>	<i>Banda única</i>
<i>BSA</i>	<i>Albumina de Suero Bovino</i>
<i>CN</i>	<i>Control Negativo</i>
<i>CP</i>	<i>Control Positivo</i>
<i>DB</i>	<i>Doble banda</i>
<i>DMSO</i>	<i>Dimetil sulfóxido</i>
<i>ELISA</i>	<i>Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas</i>
<i>GPC</i>	<i>Granja de Ponedora Comercial</i>
<i>GRP</i>	<i>Granja de Reproductoras Pesadas</i>
<i>IgA</i>	<i>Inmunoglobulina A</i>
<i>IgG</i>	<i>Inmunoglobulina G</i>
<i>IgM</i>	<i>Inmunoglobulina M</i>
<i>Kpb</i>	<i>Kilo pares de bases</i>
<i>MC</i>	<i>Muestras de Campo</i>
<i>MG</i>	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>
<i>Min</i>	<i>Minutos</i>
<i>MP</i>	<i>Marcador de Peso Molecular</i>
<i>MS</i>	<i>Mycoplasma synoviae</i>
<i>msnm</i>	<i>Metros sobre el nivel del mar</i>
<i>NDV</i>	<i>Virus de Newcastle</i>
<i>pb</i>	<i>Pares de bases</i>
<i>PCR</i>	<i>Reacción en cadena de la polimerasa</i>
<i>Primer F</i>	<i>Primer Forward</i>
<i>Primer R</i>	<i>Primer Reverse</i>

---

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
<i>qPCR</i>	<i>PCR e Tiempo Real</i>
<i>RFLP</i>	<i>Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción</i>
<i>rpm</i>	<i>Revoluciones por minuto</i>
<i>Seg</i>	<i>Segundos</i>
<i>VBI</i>	<i>Virus de Bronquitis Infecciosa Aviar</i>





## Introducción

La micoplasmosis aviar es uno de los problemas de mayor importancia en la industria avícola y que produce grandes pérdidas económicas a nivel mundial. De más de cien especies de micoplasmas, 23 pueden afectar a las aves, y cuatro son los más importantes: *Mycoplasma gallisepticum*(MG), *Mycoplasma synoviae*(MS), *Mycoplasma meleagridis* (MM) y *Mycoplasma iowae* (MI) (Kleven, 2000).

Específicamente, la micoplasmosis aviar ocasionada por MG y/o MS tienen un impacto económico negativo en las explotaciones de ponedoras comerciales y reproductoras alrededor del mundo (Kleven, 2006), caracterizándose por causar disminución en la producción de huevos y baja calidad de los mismos en aves productoras de huevo comercial o por reducir la incubabilidad y ocasionar una alta tasa de mortalidad embrionaria en reproductoras livianas y pesadas, además de llevar a un alto porcentaje de descarte de pollitos y pollitas de un día de edad en las incubadoras (Nascimento et al., 2009). En pollos de engorde, por su parte, producen disminución en la ganancia de peso e incremento en la tasa de decomisos en las plantas de sacrificio y problemas articulares. Igualmente se considera que la infección por micoplasma facilita la presentación y complicación de otras infecciones respiratorias de tipo viral como la enfermedad de Newcastle y la Bronquitis infecciosa aviar o de tipo bacteriano, principalmente por *E. coli*, llevando en muchas ocasiones a la presentación de la Enfermedad Respiratoria Crónica (ERC) (Bencina, 2009). Igualmente, la presencia de micoplasmas se ha asociado a complicaciones postvacunales por contribuir en la generación de reacciones excesivas y/o prolongadas en lotes de pollos infectados (Butcher, 2002).

La dificultad para el control y erradicación de la enfermedad en las granjas está relacionada entre otras razones a la capacidad de variación en la expresión de los mayores antígenos de superficie en las cepas de campo lo cual permite la persistencia del patógeno a pesar de presentarse respuestas inmunes fuertes en las aves (Kleven, 1998). Igualmente el aumento de las zonas o áreas avícolas y el manejo de centros de producción avícolas cada vez más intensivos, contribuye de manera importante a que sea aún más difícil el control de las enfermedades de tipo respiratorio en las granjas (Abd-El-Motelib & Kleven, 1993), En la actualidad el uso de vacunas vivas y bacterinas de MG y MS es una de las alternativas para controlar los signos clínicos de la enfermedad a nivel de las granjas (Ferberwee et al., 2006; Ley et al., 1997).

En Colombia, el diagnóstico de MG y MS se ha basado principalmente en el uso de pruebas serológicas como la aglutinación rápida en placa, la Inhibición de la hemaglutinación (HI) y las pruebas de ELISA, por lo cual el empleo de herramientas diagnósticas más sensibles y específicas como las técnicas moleculares son de gran importancia para lograr establecer de una parte el origen de las infecciones y además diferenciar entre las cepas vacunales y las cepas de campo, y de esta manera poder conocer más a fondo el comportamiento de la enfermedad en las granjas y así plantear mejores medidas de control.

El manejo de las entidades infecciosas en avicultura, requiere de la aplicación de los más recientes desarrollos investigativos como puede ser el empleo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) la cual puede detectar la presencia de MG y MS a partir de su ácido nucleico y de pruebas como la PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polimorphism) y secuenciación que permiten definir si existen diferencias entre cepas de campo y la relación que éstas tengan entre sí y con cepas vacunales utilizadas para el manejo de la enfermedad a nivel de campo.

En el presente estudio, se logró la identificación de MG y MS en muestras de hisopos traqueales de aves de granjas de ponedoras comerciales y reproductoras pesadas ubicadas en los departamentos de Cundinamarca y Boyacá. Igualmente se determinaron dos patrones RFLP en las muestras de campo, uno relacionado con la cepa vacunal (Cepa F) y otro con la cepa de campo (Cepa R). Por último se logró la secuenciación y relaciones filogenéticas de un grupo de muestras de MG y MS, lo cual es el primer aporte en este campo para la industria avícola nacional.



# 1. Micoplasmosis Aviar

## 1.1 Introducción

Los micoplasmas pertenecen a la división Firmicutes, a la clase Mollicutes (mollis = suave y cutes = pared), orden Mycoplasmatales, familia Mycoplasmataceae, genero Mycoplasma (OIE, 2008). De las más de cien especies de micoplasmas, 23 pueden afectar a las aves, y cuatro son los más importantes para la industria avícola mundial: *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synoviae* (MS), *Mycoplasma meleagridis* (MM) y *Mycoplasma iowae* (MI) (Kleven, 2000). Los micoplasmas tienen un genoma de 600-1350 kpb, con 23-40 % de G-C, más de 740 genes (Papasizi et al., 2003) y funciones claras asociadas a 469 genes en el caso de MG (Browning & Markhan, 2004). Las colonias de micoplasmas tienen forma de huevo frito y no presentan pared celular ni membranas intracitoplasmáticas, solo poseen una membrana plasmática, lo cual le da particular resistencia a antibióticos como la penicilina (Razin et al., 1998), sin embargo la ausencia de pared celular los hace muy sensibles a los detergentes y solventes orgánicos.

No es fácil hacer la diferenciación entre las especies de micoplasmas por sus características morfológicas debido a su conformación pleomórfica, así como a la imposibilidad de caracterización por el método de tinción de Gram.

Los micoplasmas han sido considerados como patógenos extracelulares, pero en la actualidad algunos investigadores (Razin et al., 1998; Nascimento et al., 2009), refieren que algunas especies (*M. penetrans*) se comportan como parásitos intracelulares obligatorios y otros como organismos intracelulares facultativos.

## **1.2 *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae***

### **1.2.1 Epidemiología**

Los micoplasmas tienen distribución mundial (OIE, 2008). Se han aislado micoplasmas en pollos, gallinas, reproductoras, pavos, faisanes, codornices, patos, pavos, loros, palomas y flamencos. Muchas de estas aves, aunque no sufren la enfermedad son reservorios y transmisores de la micoplasmosis, por medio del contacto de estas con alimento, agua y las mismas aves (Christensen et al., 1994)

El periodo de incubación de MG y MS es similar, generalmente es de 11 a 21 días luego de la exposición o contacto con el agente y de manera experimental de seis a 21 días, mientras que por la vía vertical el periodo de incubación es de seis días (Cerdá, 2007; Kleven, 2000).

La transmisión horizontal de MG y MS es muy rápida entre aves de un mismo galpón y puede alcanzar el 100% de la población a las pocas semanas (Bencina, 2009). Se consideran importantes transmisores de la enfermedad a las personas, los equipos usados en las granjas, los vehículos, los insectos, y las aves infectadas (Bencina, 2009; Christensen et al., 1994).

Un estudio reporta la transmisión de MG en cuatro fases: fase 1 o fase latente (12-21 días) antes que fueran detectados anticuerpos en aves inoculadas; fase 2 (1-21 días) en la cual la infección aparece gradualmente del 5-10 % de la población; fase 3 (7-32 días) en la cual del 90-95 % de las aves desarrollan anticuerpos y una fase 4 (3-19 días) en la cual el resto de la población se torna positiva (McMartin et al., 1987).

Un factor de importancia epidemiológica es la supervivencia del micoplasma por fuera del huésped en objetos inanimados: se ha reportado que puede sobrevivir en plumas hasta 3 días, en el polvo 2 días, y hasta 77 días en instalaciones en condiciones secas y de baja temperatura (Butcher, 2002; Christensen et al., 1994).

Experimentalmente se ha observado disminución de las propiedades hemaglutinantes en cepas de MG y MS cuando las bacterias son sometidas a procesos de incubación mayores de 60 °C durante 10 minutos (Whithear, 1982) y a la presencia de algunas enzimas proteolíticas (Pollack et al., 1984), a pesar de esto, es de gran importancia el hecho de la supervivencia del patógeno durante el proceso de incubación lo que facilita su transmisión de las reproductoras a la progenie (Kempf & Gesbert, 2009; Ruiz, 2003).

Esta forma de transmisión vertical, es una de las principales razones por la cual ha sido muy difícil controlar y/o erradicar la enfermedad de los diferentes tipos de explotación avícola (Bencina, 2009). Por esta vía, la tasa de transmisión puede variar de 10-40 % de manera experimental (Cerdá, 2007) Aunque se sabe que la transmisión de MG a través del huevo es muy baja, probablemente no más de 2 % de transmisión en las reproductoras, el verdadero problema es al momento del nacimiento, a nivel de la incubadora donde debido a la transmisión horizontal, es muy probable que en pocos días-semanas todo el lote sea expuesto al patógeno (Bencina, 2009). Es importante tener en cuenta que la transmisión puede detenerse en algunos momentos o periodos y reactivarse bajo condiciones de estrés (Butcher, 2002), presencia de otros patógenos bacterianos y/o virales y a condiciones medioambientales predisponentes.

En granjas multiedades, los micoplasmas tienden a perdurar en el tiempo ya que cuando ingresan aves nuevas a la granja, éstas se contaminan de las aves mayores que se han infectado o enfermado, originando así un ciclo que perpetúa la enfermedad (Kleven & Hofacre, 2006).

Se ha descrito la actividad protectora de IgA, IgM e IgG en aves infectadas con Micoplasmas (Bencina et al., 2005), a pesar de esto no existe una relación directa entre los títulos de anticuerpos circulantes y el grado de protección contra la infección. La participación de la inmunidad celular contra la micoplasmosis no está del todo estudiada y entendida (Razin et al., 1998; Nascimento et al., 2009).

En Francia, un estudio molecular estableció la prevalencia de la infección por MS en aves ponedoras de más de 60 semanas y encontró un 68% de positividad, siendo estadísticamente mayor la presentación en granjas multiedad, sin encontrarse diferencias estadísticas en parámetros de producción y mortalidad comparado con granjas negativas

aunque sí fueron más altos para las granjas infectadas (Dufour-Gesbert et al., 2006). Del mismo modo, se ha estimado que al menos el 50 % de la industria de huevo en USA es positiva a MG y/o MS (Evans et al., 2005).

En Latinoamérica, se han realizado ensayos de campo donde se ha demostrado una alta prevalencia de micoplasmas asociada a pérdidas en producción de huevo (Borges et al., 1999; Chirinos et al., 2000). En Argentina, el primer aislamiento de MS fue reportado por (Cerdá et al., 1998), y en Cuba reportan la presencia de *M. pullorum* en ponedoras con sintomatología respiratoria (Lobo et al., 2002)

En Colombia, se han realizado algunos estudios de tipo serológico para conocer la situación de la micoplasmosis en granjas avícolas, en la región del Tolima se reportó 74 % de seropositividad para MG y 63 % para MS en granjas de aves reproductoras (Colmenares & Latorre, 1987), mientras que en dos zonas del centro del país se reporta un 61 % de positividad a MG en pollos de engorde con historia de problemas respiratorios (Bustos, 1988) y otro estudio no encontró diferencias en los títulos de HI de la progenie de lotes de pollos de engorde provenientes de reproductoras vacunadas y no vacunadas contra *Mycoplasma gallisepticum* (Corredor et al., 1993). En el año 2000, el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), reporta un 22 % de positividad a MG en 41 lotes de reproductoras de cuatro empresas mediante el uso de PCR (Mossos, 2000). Más recientemente, en la zona de Santander se reportó un 72 % de positividad a MS en granjas de reproductoras y 10 % de positividad a MG en pollos de engorde (Uribe, 2006).

### **1.2.2 Patogenicidad**

Se cree que el MG genera productos sobre las células epiteliales como amoníaco, peróxido de hidrógeno y ion superóxido que permite la disrupción de las funciones de la célula huésped y de esta manera se desencadena la respuesta del organismo (Elfaki et al., 1993).

La gran flexibilidad genómica es una de las características que le permite a los micoplasmas establecer infecciones crónicas. Los cromosomas de los micoplasmas



sufren reordenamientos, inserciones y deleciones que generalmente son inducidos por recombinación homóloga mediada por la proteína RecA (Fonseca et al., 2007).

Las lipoproteínas del tipo hemaglutinina codificadas por el gen *v/hA* de MS presentan una alta frecuencia de variación antigénica y está relacionada con la patogenicidad del MS, ya que una vez la bacteria está en la superficie celular debe tener mecanismos para escapar de la respuesta del huésped. Los mecanismos moleculares de la recombinación del gen *v/hA* aún no están bien entendidos (Fonseca et al., 2007).

El gen *mgc2* codifica para proteínas de adhesión (citoadhesinas), las cuales son de gran importancia para todo el proceso de infección ya que son las encargadas de adherirse a las membranas mucosas y de esta manera iniciar el proceso de infección (Hnatow et al., 1998).

Los micoplasmas poseen una alta capacidad de variación en la expresión de los mayores antígenos de superficie en las cepas de campo lo cual permite la persistencia del patógeno a pesar de presentarse respuestas inmunes fuertes en las aves (Kleven, 1998).

### 1.2.3 Diagnóstico

A través del tiempo se han desarrollado diferentes técnicas de diagnóstico para la micoplasmosis, siendo las serológicas las de mayor empleo debido probablemente a su disponibilidad y facilidad de manejo, así como a la posibilidad de serotificación para algunas especies (Bencina et al., 1987; Bradbury & McClenaghan, 1982). Este tipo de pruebas son de tipo indirecto y miden la presencia de anticuerpos contra el agente. Entre éstas se dispone de la Prueba Rápida en Placa con antígeno para MG y MS, la cual es usada como prueba tamiz (presencia o no del agente), permite la detección de títulos bajos de anticuerpos, principalmente del tipo IgM en infecciones tempranas, de 7-10 días post-infección (Cerdá, 2007). No hay estándares internacionales para interpretar estas pruebas, pero una proporción alta de sueros positivos en un lote (10% o más) indica infección por MG (OIE, 2004). Este tipo de prueba presenta reacciones falsas positivas cuando se han aplicado bacterinas recientemente a (Hnatow et al., 1998) diferentes tipos de micoplasmas. Igualmente es posible detectar anticuerpos aglutinantes y pruebas de PCR positivas antes de la presentación de síntomas clínicos (Cerdá, 2007).

Existen comercialmente diversos kits de pruebas de ELISA (IDEXX®, Synbiotics®) que poseen excelente sensibilidad y especificidad, pero pueden ocurrir reacciones no específicas (Bencina, 2009). Estos kits son muy sensibles para la detección de IgG, haciéndolos de gran utilidad para el rastreo de micoplasmosis en pollitos recién nacidos (Rios et al., 2005). Normalmente las pruebas de ELISA detectan anticuerpos de 15-21 días post-infección. Se han desarrollado en los últimos años pruebas de ELISA que utilizan anticuerpos monoclonales específicos que la hacen una herramienta diagnóstica más confiable (Bencina, 2009). Del mismo modo se han desarrollado test de ELISA capaces de reconocer la respuesta de anticuerpos específica de manera simultánea a más de una especie de micoplasma (Mardassi et al., 2008). Recientemente se ha descrito la técnica ERIFA (Test enzimático rápido de inmunofiltración) usando la proteína PvpA como antígeno específico de especie, como una nueva alternativa de test screening a partir de sueros para la detección de MG (Buyuktanir et al., 2008)

Las cepas de baja virulencia de MG inducen típicamente una baja respuesta de anticuerpos y su aislamiento de casos clínicos puede ser difícil. Esto puede ser cierto, si la superficie antigénica de la cepa de MG involucrada, no reacciona bien con la cepa usada para producir el antígeno de la prueba. También se ha encontrado variabilidad entre las cepas y la respuesta clínica para MS (Dufour-Gesbert et al., 2006).

Otra técnica empleada es la Inhibición de la Hemaglutinación (HI), la cual puede considerarse como confirmatoria para las dos anteriores y ha sido utilizada ampliamente para la evaluación de los programas vacunales (Abd-El-Motelib & Kleven, 1993), gracias a que el MG y MS de manera natural tienen la capacidad de aglutinar eritrocitos mediante la adhesión de estos a los receptores de ácido neuramínico (Pollack et al., 1984). Tiene como limitantes que no existe gran cantidad de antígenos comerciales para su realización, haciendo que su montaje no esté normalizado para todos los laboratorios y que requiere de personal entrenado para su correcta interpretación. Otro tipo de pruebas usadas para diagnóstico de la bacteria son la Inmunofluorescencia y la Inmunoperoxidasa (Bencina & Bradbury, 1992).

Los cultivos de micoplasma que usualmente preceden técnicas de identificación precisas como inmunofluorescencia e inhibición de crecimiento son también utilizados con cierta

frecuencia como herramientas adicionales de diagnóstico que pueden confirmarse mediante las prueba de PCR (Evans et al., 2009).

### 1.2.4 Diagnóstico molecular

En los últimos años, son numerosos los trabajos realizados con las técnicas de PCR para el estudio de la micoplasmosis aviar (García et al., 2005; Kiss et al., 1997; Kojima et al., 1997; Nascimento et al., 1993; Sanchez et al., 2005a) al igual que estudios filogenéticos para determinar las relaciones entre los diferentes micoplasmas (Ramirez et al., 2008; Raviv & Kleven, 2009). Este tipo de pruebas son una alternativa rápida y sensible comparada con los métodos tradicionales de cultivo, los que requieren de medios y reactivos especializados, demandan un mayor tiempo y no siempre se logra el aislamiento de la bacteria.

En años recientes se han utilizado diversos genes para el diagnóstico de las diferentes cepas de MG y MS en el campo. Se han utilizado PCR basados en la presencia de secuencias conservadas como es el caso del gen *mgc2* (Domanska-Blicharz et al., 2008; García et al., 2005), el cual permite una identificación preliminar de la cepas de MG por medio de la secuenciación del producto del PCR. Del mismo modo se han estandarizado pruebas usando el gen 16S (Kiss et al., 1997; Kojima et al., 1997) y el gen de la Lipoproteína (Sanchez et al., 2005a). Para MS se han normalizado PCR para diagnóstico en el cual se usa el gen *vlhA* (Hammond et al., 2009; Wetzel et al., 2010; Béjaoui et al., 2010) Todas las pruebas de PCR presentan diferencia en la sensibilidad y especificidad en la detección del MG y MS.

El análisis del polimorfismo de los fragmentos largos de restricción (de las siglas en inglés RFLP) del DNA celular completo ha mostrado ser útil para diferenciar cepas de MG mediante el uso de enzimas de restricción (Dufour-Gesbert et al., 2006; Kiss et al., 1997; Sanchez et al., 2005b). Más recientemente se ha desarrollado la Amplificación Polimórfica Aleatoria del DNA (RAPD), para la identificación de cepas específicas. Esta técnica es fácil, rápida y se constituye en un procedimiento de rutina para la identificación de cepas de MG. Esta prueba ha demostrado ser muy útil en los estudios epidemiológicos y en la identificación de las cepas específicas de MG en brotes de campo (Kleven, 2003; Kempf, 1998).

Kleven (2006) reporta situaciones en las cuales algunos lotes han tenido un bajo nivel de respuesta serológica asociados con un bajo porcentaje de amplificaciones por PCR y cultivos negativos, lo cual sugiere que pueden existir cepas atípicas que no se han detectado con métodos tradicionales.

Recientemente, se han clonado fragmentos del gen codificante para la proteína de exposición especie-específica de la citoadhesina PvpA para ser expresados como una proteína recombinante de *E. coli* y ser empleado como un antígeno potencial para diagnóstico y evitar así las reacciones serológicas cruzadas (Buyuktanir et al., 2008).

### **1.2.5 Control**

Las medidas de bioseguridad son claves en el control de las infecciones por micoplasma, incluyendo el control de aves silvestres evitando su ingreso a las instalaciones avícolas (Butcher, 2002)

El uso de antibióticos para controlar los cuadros clínicos producidos por los micoplasmas está ampliamente reportado (Gerchman et al., 2008; Reinhardt et al., 2005; Charleston et al., 1998). Así mismo está reportado que las diferentes cepas de MG y MS han ido adquiriendo resistencia a las diferentes moléculas antibióticas a través del tiempo (Pollack et al., 1984). La micoplasmosis producida por MS se ha asociado a problemas articulares y respiratorios principalmente, los cuales al ser tratados con antibióticos pueden persistir en las aves tal vez por la internalización de MS en las células del huésped causando persistencia de las infecciones en las aves (Buim et al., 2011), por lo cual estudios que involucren el desempeño zootécnico de las aves acompañados de la caracterización de las cepas actuantes son importantes para determinar cuáles de las cepas de MS que están circulando en las granjas están realmente asociadas a patologías en las aves.

Dentro de las medidas de control de la micoplasmosis aviar, se han usado bacterinas desde principios de los años 1980, las cuales generan inmunidad humoral y protegen contra los síntomas de la enfermedad y la transmisión a través del huevo (Elfaki et al.,

1993) pero son incapaces de evitar las infecciones del tracto respiratorio (Papasizi et al., 2002) y las pérdidas de huevo a nivel de campo (Abd-El-Motelib & Kleven, 1993).

Se ha evaluado diferentes rutas de administración de las bacterinas en las aves y se ha demostrado que la aplicación intracelómica protege contra los cuadros clínicos severos de aerosaculitis (Elfaki et al., 1992) y genera niveles de IgG e IgA capaces de proteger contra los retos de campo (Elfaki et al., 1993). Del mismo modo se han evaluado diferentes tipos de adyuvantes buscando generar la mayor protección con el menor efecto negativo en las aves al momento de la aplicación (Sánchez et al., 2004)

Las vacunas vivas de MG, dentro de las cuales están la cepa F, la Ts-11 y la 6-85 como las más empleadas a nivel mundial (Butcher, 2002), se han utilizado para proteger de los cuadros clínicos de la enfermedad como son la aerosaculitis y la pérdida de postura. Del mismo modo para MS se han utilizado principalmente bacterinas, las cuales protegen de la presentación de sintomatología. Las respuestas inmunes contra los cuadros de aerosaculitis generadas por este tipo de vacunas están determinadas por los niveles de virulencia de las mismas, de tal modo se sabe que la cepa F es más virulenta y produce una mejor respuesta en las aves comparado con las cepas TS-11 y 6/85 (Abd-El-Motelib & Kleven, 1993). En pavos y pollos se ha reportado el uso de una vacuna viva atenuada denominada K5054 para el control de MG, la cual coloniza efectivamente el tracto respiratorio alto es capaz de proteger contra la aerosaculitis.(Evans et al., 2005)

Se sabe que la forma de presentación de las vacunas y las vías de aplicación están relacionadas con los diferentes niveles de respuesta inmune. La seroconversión que se consigue con el uso de vacunas vivas aplicadas por vía de aspersión es muy importante en el seguimiento de los programas vacunales (Branton et al., 2010;Abd-El-Motelib & Kleven, 1993), principalmente en las granjas de producción de huevo comercial.

Del mismo modo, con el avance de las técnicas moleculares está en prueba una vacuna de tecnología recombinante en un virus de viruela denominada Vectormune FP-MG y una vacuna genéticamente modificada denominada GT5 (Nicholas et al., 2009), las cuales hasta el momento han demostrado que evita los síntomas producidos por la infección de campo (Evans et al., 2005). Esta cepa GT5 se obtuvo al insertar el gen *gapA* en la cepa  $R_{high}$  de MG y es capaz de expresar la proteína GapA en su superficie, que es una de las

principales citoadhesinas. La cepa GT5 mantiene muchas características fenotípicas de la cepa R<sub>high</sub>, incluidos bajos niveles de citoadherencia *in vitro* (Papasizi et al., 2002).

La cepa F aunque al parecer es apatógena para las gallinas de postura y reproductoras, puede ser reactiva en pavos y pollos de engorde y no se puede diferenciar por pruebas serológicas y microbiológicas convencionales (Nascimento et al., 1993). Se considera que los 220 millones de aves que tiene la industria de ponedoras de USA utiliza por lo menos una vacuna viva (Poultry Technical Service Team Schering Plough, 2004)

### 1.3 Conclusiones

La micoplasmosis aviar producida por MG y MS continua siendo uno de los mayores problemas de la industria avícola del mundo, de tal manera que el monitoreo de los lotes de aves para la detección de la enfermedad o el seguimiento de los programas vacunales es de gran importancia.

El desarrollo de las técnicas moleculares ha demostrado tener una mayor utilidad que la serología como herramienta de diferenciación de las cepas de campo de las vacunales, por lo cual su desarrollo en nuestro medio es de gran importancia para complementar el uso de las pruebas serológicas que actualmente se usan en el país debido en parte a su rápida respuesta y bajo costo.

Actualmente en Colombia el control de la micoplasmosis en los diferentes tipos de granjas avícolas, está basado principalmente en el uso de antibióticos, aunque el uso de vacunas ha venido aumentando. Para el caso de MG, existe en el mercado local una vacuna viva aprobada de la Cepa F y para MS una bacterina, por lo cual los estudios de tipo molecular a partir de muestras de campo son de gran importancia para tener una visión más específica de la situación de la enfermedad y de esta manera poder evaluar y sugerir el uso de nuevas herramientas de control, ya que por ejemplo el uso de antibióticos de manera constante puede generar resistencia y además su uso puede estar contraindicado en aquellos casos en los cuales se usan las vacunas vivas, lo que es una limitante en el control del problema cuando se presentan infecciones mixtas de MG y MS.

## Bibliografía

ABD-EL-MOTELIB, T.; KLEVEN, S. A comparative study of *Mycoplasma gallisepticum* vaccines in young chickens. Avian Dis 37, 981-987. 1993.

BÉJAOU, A.; GUÉRIRI, I.; MOHAMMED, R.; ABDELMOUMEN, B. Characterization of a variant *vlhA* gene of *Mycoplasma synoviae*, strain WVU 1853, with a highly divergent haemagglutinin region. BMC Microbiology 10[6], 1-9. 2010.

BENCINA, D.; DORRER, D.; TADINA, T. Mycoplasma species isolated from six avian species. Avian Pathol 16, 653-664. 1987.

BENCINA, D.; NARAT, M.; BIDOVEC, A.; ZORMAN-ROJS, O. Transfer of maternal immunoglobulins and antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* to the allantoic and amniotic fluid of chicken embryos. Avian Pathol 34[6], 463-472. 2005.

BENCINA, D. Mycoplasma Infections. Biotechnical Faculty University of Ljubjana , 1-11. 2009.

BENCINA, D.; BRADBURY, J. Combination of immunofluorescence and immunoperoxidase techniques for serotyping mixtures of Mycoplasma species. J Clin Microbiol 30[2], 407-410. 1992.

BORGES, F.; GODOY, A.; VALLE, A. Disminución en la producción de huevos por micoplasmosis en granjas del estado de Aragua. Zootecnia Trop 17, 261-276. 1999.

BRADBURY, J.; MCCLENAGHAN, M. Detection of Mixed Mycoplasma Species. J Clin Microbiol 16[2], 314-318. 1982.

BRANTON, S.; LEIGH, S.; PURSWELL, J.; OLAREWAJU, H.; COLLIER, S. Effect of Selected Water Temperatures Used in *Mycoplasma gallisepticum* Vaccine Reconstitution on Titer at Selected Time Intervals. Avian Dis 52, 291-296. 2008.

BROWNING, G.; MARKHAN, P. Determination of the Genomic Sequence of *Mycoplasma Gallisepticum*. 1-13. 2004. Rural Industries Research and Development Corporation.

BUSTOS, F. Prevalencia serológica para algunas enfermedades en pollos de engorde. Sistemas de producción avícola, 246-255. 1988. ICA.

BUTCHER, G. *Mycoplasma gallisepticum* - A Continuing Problem in Commercial Poultry. University of Florida; 2002.

BUYUKTANIR, O.; YILDIRIM, T.; YAKICIER, C.; GENÇ, O.; YURDUSEV, N. A recombinant PvpA protein-based diagnostic prototype for rapid screening of chicken *Mycoplasma gallisepticum* infections. Vet. Microbiol. 129, 139-149. 2008.

CERDÁ, R.; XAVIER, J.; PETRUCCELLI, M.; ETCHEVERRYGARAY, M. Aislamiento de *Mycoplasma synoviae* en pollos parrilleros y gallinas reproductoras. Primera comunicación en la Republica Argentina. Analecta Veterinaria 18[1], 41-46. 1998.

CERDÁ, R. Medidas de Prevención y Control de la Micoplasmosis en Latinoamérica. XX Congreso Latinoamericano de Avicultura, 111-124. 2007.

CHARLESTON, B.; GATE, J.; AITKEN, I.; REEVE-JOHNSON, B. Assessment of the efficacy of tilmicosin as a treatment for *Mycoplasma gallisepticum* infections in chickens. Avian Pathol 27, 190-195. 1998.

CHIRINOS, B.; ICOCHEA, E.; GAVIDIA, C.; NOÉ, N. Evaluación de la prueba de inhibición de la hemaglutinación vs. ELISA para la detección de anticuerpos contra *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae*. Rev.investig.vet.Perú 11(1), 40-44. 2000.

CHRISTENSEN, N.; YAVARI, C.; MCBAIN, A.; BRADBURY, J. Investigations into the survival of *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma iowae* on materials found in the poultry house environment. Avian Pathol 23 (1), 127-143. 1994.



COLMENARES, M; LATORRE, S. Determinación serológica de anticuerpos contra micoplasmas patógenos, *Salmonella pullorum* y presencia de anticuerpos vacunales de Newcastle en reproductores. Universidad del Tolima. 1987.

CORREDOR, A.; RUEDA, N.; CORTAZAR, M. Determinación de anticuerpos de la cepa F de *Mycoplasma gallisepticum* en progenies procedentes de reproductoras de pollo de engorde vacunadas y no vacunadas, 1993.

DOMANSKA-BLICHARZ, K.; TOMCZYK, G.; MINTA, Z. Comparison of different molecular methods for detection of *Mycoplasma gallisepticum*. Bull Vet Inst Pulawy 52, 529-532. 2008.

DUFOUR-GESBERT, F.; DHEILLY, A.; MAROIS, C.; KEMPF, I. Epidemiological study on *Mycoplasma synoviae* infection in layers. Vet. Microbiol. 114, 148-154. 2006.

ELFAKI, MG.; KLEVEN, S.; JIN, LH; RAGLAND, WL. Protection against airsacculitis with sequential systemic and local immunization of chickens using killed *Mycoplasma gallisepticum* bacterin with iota carrageen an adjuvant. Vaccine 11(3), 311-317. 1993.

EVANS, J.; LEIGH, S.; BRANTON, S.; COLLIER, S.; PHARR, G.; BEARSON, S. *Mycoplasma gallisepticum*: current and developing means to control the avian pathogen. J Appl Poult Res; 14:757-763. 2005

EVANS, J.; THORNTON, D.; BRANTON, S. Diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* from a Broiler Breeder Flock: Comparison of Three Diagnostics Methods. Int.J.Poult.Sci 8[2], 104-107. 2009.

FONSECA, M.; ALARCON, F.; VASCONCELOS, A.; AGNEZ-LIMA, L. A model for the RecA protein of *Mycoplasma synoviae*. Genet.Mol.Biol. 30 (1), 290-295. 2007.

GARCÍA, M.; IKUTA, N.; LEVISOHN, S.; KLEVEN, S. Evaluation and Comparison of Various PCR Methods for Detection of *Mycoplasma gallisepticum* Infection in Chickens. Avian Dis 49 (1), 125-132. 2005.

GERCHMAN, I.; LYSNYANSKY, I.; PERK, S.; LEVISOHN, S. In vitro susceptibilities to fluoroquinolones in current and archived *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* isolates from meat-type turkeys. *Vet. Microbiol.* 131, 266-276. 2008.

HAMMOND, P.; RAMIRES, A.; MORROW, C.; BRADBURY, J. Development and evaluation of an improved diagnostic PCR for *Mycoplasma synoviae* using primers located in the haemagglutinin encoding gene *vlhA* and its value for strain typing. *Vet. Microbiol.* 136, 61-68. 2009.

HNATOW, LL.; KEELER, CI.; TESSMER, LI.; CZYMMEK, K.; DOHMS, JE. Characterization of MGC2, a *Mycoplasma gallisepticum* Cytadhesin with homology to the *Mycoplasma pneumoniae* 30-Kilodalton Protein P30 and *Mycoplasma genitalium* P32. *Infect Immun* 66[7], 3436-3442. 1998.

KEMPF, I.; GESBERT, F. Comparison of serological tests for detection of *Mycoplasma gallisepticum* antibodies in eggs and chicks hatched from experimentally infected hens. *Vet. Microbiol.* 60, 207-213. 2009.

KEMPF, I. DNA amplification methods for diagnosis and epidemiological investigations of avian mycoplasmosis. *Avian Pathol* 27 (1), 7-14. 1998.

KISS, I.; MATIZ, K.; KASZANYITZKY, E.; CHAVEZ, Y.; JOHANSSON, K. Detection and identification of avian mycoplasmas by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism assay. *Vet. Microbiol.* 58, 23-30. 1997.

KLEVEN, S. Mycoplasmas in the Etiology of Multifactorial Respiratory Disease. *Poult. Sci.* 77, 1146-1149. 1998.

KLEVEN, S.; HOFACRE, C. Current implications in the field of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* on broilers and laying hen production. *The Poultry Informed Professional* [90], 1-3. 2006.

KLEVEN, S. Control de Micoplasma. Situación Actual. AMEVEA, editor. XXVII Seminario Avícola Internacional. 2006.

KLEVEN, S. Micoplasmosis. In: Calneck BW, editor. Enfermedades de las Aves. 2 ed. Manual Moderno; 195-239. 2000

KLEVEN, S. *Mycoplasma synoviae* infection. In: Saif Y, Barnes H, Glisson J, Fadly A, McDougald L, Swayne D, editors. Diseases of Poultry. 11 ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press; 224-233. 2003.

KOJIMA, A.; TAKAHASHI, T.; KIJIMA, M.; OGIKUBO, Y.; NISHIMURA, M.; NISHIMURA, S. Detection of Mycoplasma in Avian Live Virus Vaccines by Polymerase Chain Reaction. *Biologicals* 25, 365-371. 1997.

LOBO, E.; CHAVEZ, Y.; AGÜERO, J.; MARTÍNEZ, S.; MOSCOSO, H.; GARCÍA, M. Aislamiento e identificación de *Mycoplasma pullorum* como cepa de nuevo reporte en Cuba. *Revista Cubana de Ciencia Avícola* 26, 103-109. 2002.

MARDASSI, B.; BÉJAOUÏ, A.; OUSSAEÏF, L.; MLIK, B.; AMOUNA, F. A Recombinant Antigen-Based ELISA for the Simultaneous Differential Serodiagnosis of *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma meleagridis* infections. *Avian Dis* 52, 214-221. 2008.

MCMARTIN, DA.; KHAN, MI.; FARVER, TB.; CHRISTIE, G. Delineation of the lateral spread of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. *Avian Dis* 31, 814-819. 1987.

MOSSOS, N. Micoplasma. Foro Nacional Avícola. 2000.

NASCIMENTO, E.; PEREIRA, V.; NASCIMENTO, M.; BARRETO, M. Avian Mycoplasmosis Update. *Braz J Poult Sci* 7[1], 1-9. 2009.

NASCIMENTO, E.; YAMAMOTO, R.; KHAN, M. *Mycoplasma gallisepticum* F-Vaccine Strain-Specific Polymerase Chain Reaction. *Avian Dis* 37[1], 203-211. 1993.

NICHOLAS, R.; AYLING, R.; MCAULIFFE, L. Vaccines for Mycoplasma diseases in animals and man. *J.Comp.Path* 140, 85-96. 2009.

OIE. Micoplasmosis aviar (*Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*). OIE, editor. Manual OIE sobre animales terrestres , 1-17. 2008.

OIE. Micoplasmosis Aviar - *Mycoplasma gallisepticum*. OIE, editor. Manual de la OIE sobre animales terrestres, 905-919. 2004.

PAPASIZI, L.; GORTON, T.; KUTISH, G.; MARKHAN, P.; BROWNING, G.; NGUYEN, D. The complete genome sequence of the avian pathogen *Mycoplasma gallisepticum* strain Rlow. *Microbiology* 149, 2307-2316. 2003.

PAPASIZI, L.; SILBART, L.; FRASCA, S.; ROOD, D.; LIAO, X.; GLADD, M. A modified live *Mycoplasma gallisepticum* vaccine to protect chickens from respiratory disease. *Vaccine* 20, 3709-3719. 2002.

POLLACK, J.; BEAMAN, K.; TRYON, V. Supplement to current insights in Mycoplasma. *Yale Journal of Biology and Medicine* 57, 891-908. 1984.

POULTRY TECHNICAL SERVICE TEAM SCHERING PLOUGH. Control of *Mycoplasma Gallisepticum* in layers. *International Poultry Production* 13[1], 21-22. 2004.

RAMIREZ, AS.; NAYLOR, C.; PITCHER, DG.; BRADBURY, J. High inter-species and low intra-species variation in 16S–23S rDNA spacer sequences of pathogenic avian mycoplasmas offers potential use as a diagnostic tool. *Vet. Microbiol.* 128, 279-287. 2008.

RAVIV, Z.; KLEVEN, S. The Development of Diagnostic Real-Time TaqMan PCRs for the Four Pathogenic Avian Mycoplasmas. *Avian Dis* 53, 103-109. 2009.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAUD, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 62, 1094-1156. 1998.

REINHARDT, AK.; GAUTIER-BOUCHARDON, AV.; GICQUEL-BRUNEAU, M.; KOBISCH, M.; KEMPF, I. Persistence of *Mycoplasma gallisepticum* in chickens after

treatment with enrofloxacin without development of resistance. *Vet. Microbiol.* 106, 129-137. 2005.

RÍOS, P.; RAMÍREZ, A.; ICOCHEA, E.; NOÉ, N.; LEVISOHN, S. Detección de *Mycoplasma synoviae* (MS) y anticuerpos anti-MS en embriones de gallinas naturalmente infectadas. *Rev.investig.vet.Perú* 5-6[1], 1-7. 2005.

RUIZ, J. Actualidades en el manejo y control de la micoplasmosis aviar. XXIV Seminario Avícola Internacional AMEVEA. 2003.

SANCHEZ, B.; REDONDO, H.; BRANDY, L.; MARTÍNEZ, A.; RODRIGUEZ, M. Detección de cepas de *Mycoplasma gallisepticum* por PCR a tiempo real sobre los genes *LP* y *mgc2*, en swabs traqueales con PBS y medio Frey. XLII Symposium Científico de Avicultura, 2005.

SANCHEZ, B.; REDONDO, H.; RODRIGUEZ, M. Diferenciación de cepas vacunales de *Mycoplasma gallisepticum* 6/85 (Like-6/85), en muestras de campo mediante AP-PCR sobre genes *PMGA*, RFLP-PCR y secuenciación sobre genes *Lp* y *mgc2*. XLII Symposium Científico de Avicultura, 2005.

URIBE, A. Diagnóstico y control de la micoplasmosis aviar. XXVII Seminario Avícola Internacional. AMEVEA. 2006

WETZEL, A.; LEFEVRE, K.; RAVIV, Z. Revised *Mycoplasma synoviae* v1hA PCRs. *Avian Dis* 54 (4), 1292-1297. 2010.

WHITHEAR, K. Reviews of Infectious Diseases. Current Topics in Mycoplasmatology, 1982.



## 2. Detección de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* mediante la técnica de PCR a partir de hisopos traqueales

### 2.1 Resumen

Se determinó en 63 explotaciones avícolas de ponedoras (GPC) y 30 de reproductoras pesadas (GRP) de los departamentos de Cundinamarca y Boyacá la presencia de *Mycoplasma gallisepticum* (MG) en un 48.2% y de *Mycoplasma synoviae* (MS) en un 69.9 % de 193 muestras tomadas de hisopos traqueales. Se empleó la técnica de PCR, amplificando una porción de los genes *mgc2* de MG y *vlhA* de MS. Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los dos tipos de explotación y la presentación de MG y MS, así como para las variables edad del lote y raza de aves, encontrándose un mayor porcentaje de positividad en lotes de mayor edad. Para las GPC se encontró diferencias significativas entre el número de lotes presentes en las granjas y la presentación de MG. Variables como el nivel de bioseguridad, la altitud de las granjas, el tamaño de los lotes, el tipo de instalaciones y el uso de vacunas de MG no presentaron diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ ) con la presentación de ambos patógenos. Se estableció la presencia de infecciones mixtas de MG y MS: 55.2 % en GPC y 8.3 % en GRP con diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) entre éstas y la edad de los lotes, siendo los de mayor edad las que presentaron el más alto porcentaje de positividad. En algunas muestras positivas a MS se encontró la presencia de dos y tres amplicones, lo que sugiere la presencia de igual número de cepas de MS en un mismo lote.

Lo establecido en el presente estudio, pone de manifiesto que la micoplasmosis es un problema sanitario que está presente en explotaciones avícolas comerciales y que amerita hacer estudios más extensos que permitan establecer cuál es su impacto en la industria avícola nacionales.

## 2.2 Abstract

To determine the presence of *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and *Mycoplasma synoviae* (MS) in 63 layer farms (GPC) and 30 breeder farms (GRP) from Cundinamarca and Boyacá states, a total of 193 tracheal swab samples were analyzed by PCR using the *mgc2* and *vlhA* genes respectively. The results showed that MG was present in a 48.2 % and MS in a 69.9 % of the samples. Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) were found when comparing GPC and GRP, flock ages and bird breed. A higher percentage of MG and MS positivity was found in older flocks. Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) were found in GPC for MG presence and the number of flocks present in the farm. On the other hand, variables such as biosecurity standards, altitude, flock size, type of facilities and use of MG live vaccines didn't show statistically significant differences ( $p > 0.05$ ) for the presentation of any of the pathogens. Mixed infections were found in 55.2 % of the GPC and 8.3 % of the GRP samples. Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) were found between flock age and mixed infections. In some of the MS positive samples, a double amplicon was present suggesting the presence of equal number of strains of MS at the same time in the flocks.

Results from this study confirm that *Mycoplasma* is a pathogen which is frequently present in GPC and GRP and that it is necessary to conduct additional studies in order to establish its role in pathogenesis and the impact of mycoplasma infections for the local poultry industry.

## 2.3 Introducción

La micoplasmosis aviar ocasionada por *Mycoplasma gallisepticum* (MG) y/o *Mycoplasma synoviae* (MS) es considerada una de las enfermedades aviares de mayor impacto económico en las explotaciones de pollos de engorde, ponedoras comerciales y reproductoras alrededor del mundo (Kleven, 2006), siendo una enfermedad de declaración obligatoria de acuerdo con la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2004).



La micoplasmosis aviar es de gran importancia por el impacto negativo que ocasiona en los parámetros productivos, caracterizándose por causar disminución en la producción de huevos y baja calidad de los mismos en aves productoras de huevo comercial o por reducir la incubabilidad y ocasionar una alta tasa de mortalidad embrionaria en reproductoras livianas y pesadas, además de llevar a un alto porcentaje de descarte de pollitos y pollitas de un día de edad en las incubadoras y a un aumento de la conversión alimenticia<sup>1</sup> en las granjas de producción (Nascimento et al., 2009). En pollos de engorde, por su parte, produce disminución en la ganancia de peso e incremento en la tasa de decomisos en las plantas de sacrificio. Igualmente se considera que la infección por micoplasma facilita la presentación y complicación de otras infecciones respiratorias de tipo viral como la enfermedad de Newcastle y la Bronquitis infecciosa aviar o de tipo bacteriano, principalmente por *E. coli*, llevando en muchas ocasiones a la presentación de la Enfermedad Respiratoria Crónica (ERC) (Bencina, 2009). Igualmente, la presencia de micoplasmas se ha asociado a complicaciones postvacunales por contribuir en la generación de reacciones excesivas y/o prolongadas en lotes de pollos infectados (Butcher, 2002).

El diagnóstico de la enfermedad se basa principalmente en pruebas serológicas como la prueba de aglutinación rápida en placa, la técnica de ELISA y la prueba de Inhibición de la hemaglutinación. El aislamiento bacteriano es otro método de diagnóstico, pero es dispendioso y costoso por lo cual su uso es limitado.

El incremento en el uso de vacunas vivas y bacterinas de MG y MS como forma de controlar los signos clínicos de la enfermedad a nivel de las granjas (Feberwee et al., 2006; Ley et al., 1997), hace necesario el empleo de herramientas diagnósticas más sensibles y específicas que permitan establecer de una parte el origen de las infecciones y además diferenciar entre las cepas vacunales y las cepas de campo, lo cual es indispensable para conocer el comportamiento de la enfermedad en las granjas y así plantear mejores medidas de control.

---

<sup>1</sup> Parámetro zootécnico que evalúa la eficiencia productiva del alimento en las explotaciones avícolas, relacionando los kilos de alimento consumidos con los kilos de producción obtenidos.

En Colombia se ha reportado positividad a MG y MS a través de pruebas de aglutinación rápida en placa, Inhibición de la hemaglutinación (HI) y de ELISA. En la década del 80, se reportó en lotes de reproductoras de 16 y 71 semanas de edad ubicadas en el departamento de Santander un 74 % de positividad serológica para MG y de 44.4 % para MS (Colmenares & Latorre, 1987), un trabajo más reciente (Uribe, 2006), reporta seropositividad del 72 % a MS por la prueba de ELISA en granjas de reproductoras. La presencia serológica de MG y MS en el país desde hace un par de décadas confirman la actividad de la bacteria en las granjas, por lo cual los estudios a nivel molecular son una herramienta de gran importancia para lograr caracterizar las cepas y poder hacer una mejor aproximación al origen de las infecciones en las granjas.

El empleo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que puede detectar la presencia de la bacteria a partir de su ácido nucleico, es una alternativa diagnóstica que ofrece una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico.

En el presente estudio, mediante el empleo de metodologías moleculares se detectó la presencia de MG y MS en los departamentos de Cundinamarca y Boyacá.

## **2.4 Materiales y Métodos**

### **2.4.1 Granjas y aves seleccionadas**

Según el censo nacional avícola (FENAVI, 2009) en Cundinamarca existen 563 GPC y 77 GRP, mientras que en Boyacá hay 106 GPC y 15 GRP. Se invitaron a participar en el estudio directamente a las gerencias de las compañías avícolas y se recibió respuesta confirmatoria de un total de 63 granjas de ponedoras comerciales (GPC) y 30 granjas de reproductoras pesadas (GRP).

### **2.4.2 Muestras del estudio**

El muestreo se llevó a cabo durante los meses de enero de 2010 y marzo de 2012. Al momento de la visita de muestreo, se tomaron hisopos traqueales (Sanchez et al., 2005a; OIE, 2008) de 45 animales por cada uno de los lotes presentes en las granjas, usando un hisopo humedecido en PBS por cada tres aves. En el laboratorio se realizó el

lavado del total de 15 hisopos tomado por cada uno de los lotes como un pool, para su posterior uso como una única muestra. Las muestras fueron conservadas en un recipiente estéril a -20 °C hasta su procesamiento en el laboratorio.

Para cada muestra, se levantó un registro de información con datos como: ubicación de la granja, tipo de explotación, población total de la granja, número de lotes presentes en la granja, datos zootécnicos y medidas usadas dentro de los esquemas de bioseguridad. En total fueron tomadas 193 muestras (lotes).

### **2.4.3 Extracción de ADN**

Para la extracción de ADN se empleó un procedimiento modificado de (Hernández et al., 2009; OIE, 2008) a partir del lavado del pool de hisopos de cada uno de los lotes muestreados, el cual consistió en tres lavados sucesivos en solución de PBS (Anexo 1) y centrifugación a 14.000 rpm por 10 min cada vez, seguido de resuspensión del pellet en 40 µl de PBS como volumen de elución y posterior calentamiento a 100 °C por 10 min y luego a un enfriamiento de -20 °C por 10 min. Por último se centrifugó a 14.000 rpm por 10 min y se transfirieron los sobrenadantes a un tubo libre de nucleasas y se conservaron a -20 °C hasta su uso.

### **2.4.4 Protocolo de amplificación de *M. gallisepticum***

Se emplearon primers previamente reportados (García et al., 2005), que amplifican una región del gen *mgc2*, (Tabla 2-1), la cual codifica para proteínas de superficie que están relacionadas con la citoadherencia (Bencina, 2002). El amplificado de esta porción del gen *mgc2* permite la diferenciación de algunas cepas directamente y mediante pruebas post-PCR como la RFLP.

El volumen final de cada reacción fue de 20 µl, y se usaron los siguientes volúmenes y concentraciones: 2 µl de buffer para PCR 10 X (Invitrogen® Buffer PCR 10 X), 0.52 µl de MgCl 50 mM (Invitrogen® MgCl 50 mM), 0.4 µl de nucleótidos a 10 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP Invitrogen®), 0.16 µl de primer F (50 µM Invitrogen®) y 0.16 µl de primer R (50 µM Invitrogen®), Taq 0.08 µl de 5 U (Invitrogen® Platinum DNA Taq Polimerasa 5u/µl), 14.68 µl de agua y 2 µl de ADN.

### 2.4.5 Protocolo de amplificación para *M. synoviae*

Se utilizaron dos juegos diferentes de primers previamente reportados (Wetzel et al., 2010; Hammond et al., 2009; Hong et al., 2004), que anillan con el gen *vlhA* y de los cuales se esperan productos de 300 - 390 pb para el primer juego de primer (MS1) y de 450 pb para el segundo juego de primers (MS2). (Tabla 2-1). El gen *vlhA* es altamente polimórfico y codifica para proteínas del tipo hemaglutininas (Bencina, 2002) y pertenece a una familia de genes que se cree tienen un papel fundamental en la cronicidad de las infecciones por micoplasmas (Browning & Markhan, 2004)

El volumen final de cada reacción fue de 20 µl, con los siguientes volúmenes y concentraciones: 2 µl de buffer para PCR 10 X (Invitrogen® Buffer PCR 10 X), 0.8 µl de MgCl 50 mM (Invitrogen® MgCl 50 mM), 0.4 µl de nucleótidos a 10 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP Invitrogen®), 0.2 µl de primer F (50 µM Invitrogen®) y 0.2 µl de primer R (50 µM Invitrogen®), Taq 0.08 µl de 5 U (Invitrogen® Platinum DNA Taq Polimerasa 5u/µl), 14.32 µl de agua y 2 µl de ADN.

El perfil térmico empleado para MG fue: una denaturación inicial a 94 °C por 3 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 53 °C por 30 seg, 72 °C por 90 seg y una extensión final de 72 °C por 5 min.

Para MS1 y MS2 se empleó el siguiente perfil térmico: denaturación inicial a 94 °C por 3 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 57 °C por 30 seg, 72 °C por 90 seg y una extensión final de 72 °C por 5 min.

Para ambos casos se empleó un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient®

**Tabla 2-1:** Primers utilizados en las PCR de MG y MS

Primers	Secuencia	Producto	Referencia
MG-F	5' CGCAATTTGGTCCTAATCCCCAACA 3'	237 pb - 300 pb	García <i>et al.</i> , 2005
MG-R	5' TAAACCCACCTCCAGCTTTATTTC 3'		
MS-F 1	5' CCATTGCTCCTGCTGTTAT 3'	300 -395 pb	Wetzel <i>et al.</i> , 2010
MS-R 1	5' GATTCTGTTGTAGTTGCTTCAA 3'		
MS-F 2	5' AGTAACCGATCCGCTTAATGC 3'	450 pb	Hong <i>et al.</i> , 2004
MS-R 2	5' GATGCGTAAAATAAAAGGAT 3'		Hammond <i>et al.</i> , 2009

## 2.4.6 Controles de la prueba

Como controles positivos de las reacciones se emplearon cepas vacunales: para el caso de MG se usó F-VAX-MG® que contiene la cepa F (Intervet-Schering Plough®), y Nobilis MG 6/85® (Intervet®) y para MS la vacuna MSBac® que contiene la cepa WVU-1853 (Fort Dodge Animal Health®). Como control negativo se usó PBS.

## 2.4.7 Control de la extracción del ADN

Para verificar la calidad del ADN extraído se utilizó como Housekeeping celular, una porción del gen 28S de *Gallus gallus* (Suzuki et al., 2009), (Tabla 2-2) normalizado con las siguientes condiciones: 2 µl de buffer para PCR 10 X (Invitrogen® Buffer PCR 10 X), 0.8 µl de MgCl 50 mM (Invitrogen® MgCl 50 mM), 0.4 µl de nucleótidos a 10 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP Invitrogen®), 0.4 µl de primer F (50 µM Invitrogen®) y 0.4 µl de primer R (50 µM Invitrogen®), Taq 0.125 µl de 5 U (Invitrogen® Platinum DNA Taq Polimerasa 5u/µl), 13.88 µl de agua y 2 µl de ADN.

Como control positivo de esta reacción se utilizó ADN extraído de tejidos de pollo mediante el uso del kit QIAamp DNA Mini Kit (Quiagen®) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

El perfil térmico empleado fue: denaturación de 94 °C por 5 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 58 °C por 30 seg, 72 °C por 1 min y una extensión final de 72 °C por 10 min. Se utilizó un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient®

**Tabla 2-2:** Primers de *Gallus gallus* usados como *housekeeping* celular

Primers	Secuencia	Producto	Referencia
28S-F	5' GGCGAAGCCAGAGGAAACT 3'		
28S-R	5' GACGACCGATTTGCACGTC 3'	61 pb	Suzuki et al., 2009

### 2.4.8 Ensayos de sensibilidad y especificidad de las pruebas

La especificidad de las PCR de MG y MS1 y MS2 fue evaluada utilizando ADN de diferentes controles de MG, MS y del Herpes Virus Equino y RNA de los virus de Diarrea Viral Bovina, virus de Bronquitis Infecciosa Aviar y virus de la Enfermedad de Gumboro.

La sensibilidad de las pruebas se estableció para MG y MS mediante el análisis serial de diluciones en base 10, desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-9}$  de los ADN usados como controles de las pruebas y a los cuales se les realizó la cuantificación mediante el Nanodrop 2000® (Thermo Scientific®) Ver Tabla 2-3. Para la extracción del ADN se usó el kit de extracción QIAamp DNA Mini Kit (Quiagen®) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

**Tabla 2-3:** Concentración de ADN de controles de MG y MS

Control	Concentración ADN
MG-F-VAX-MG®	16.4 ng/μl
Nobilis MG 6/85®	115.5 ng/μl
MS- MSBac®	25.1 ng/μl

### 2.4.9 Lectura de la prueba

Los productos amplificados del PCR fueron determinados por electroforesis en gel de agarosa ultrapura (Invitrogen®) al 1.5% en buffer TAE 1 X (Anexo 3), en un equipo PowerPac HC® (Bio-Rad Laboratories®) a 85 V por 95 min. Se usaron 5 μl de producto de PCR y 1 μl de EZ-Vision® (Amresco Life Science Research®) como buffer de carga y colorante. Como marcador de peso molecular (MP) se empleó el DNA GeneRuler 100 pb Plus® (Fermentas®). La lectura se hizo en un fotodocumentador GelDoc-XR® (Bio-Rad Laboratories®) bajo luz ultravioleta. Para el análisis de los geles se usó el software Quantity One Analysis 1-D 4.6.3 ® (Bio-Rad Laboratories®)

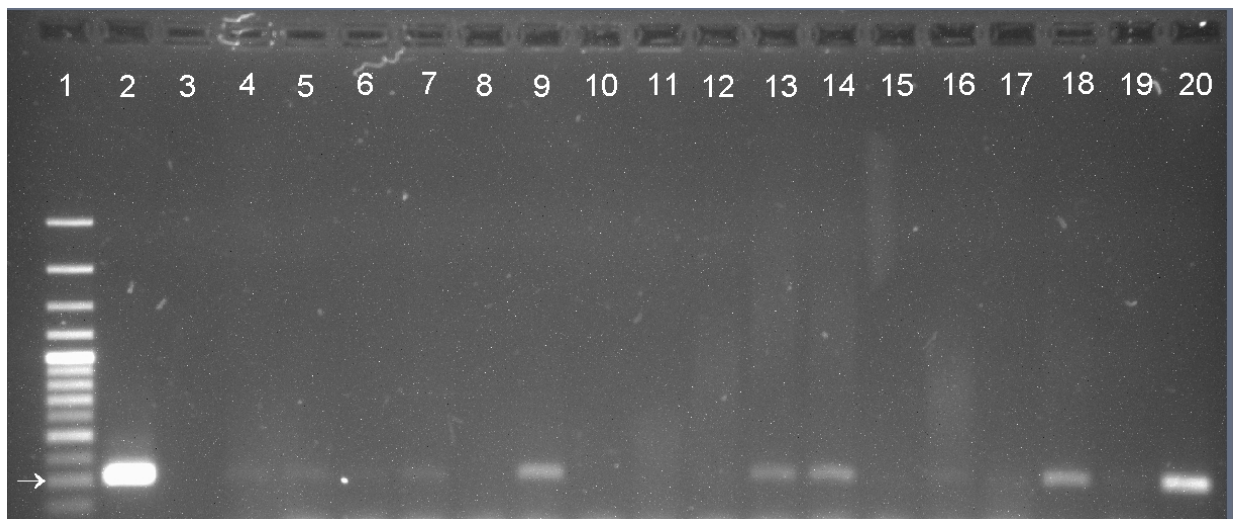
## 2.4.10 Análisis Estadístico

Se empleó estadística descriptiva para las diferentes variables y se analizaron los datos mediante pruebas de correlación de variables como el chi cuadrado y pruebas de regresión logística con el software estadístico *Statistix 8.0*

## 2.5 Resultados

Se normalizó la técnica de PCR para diagnóstico de MG y MS a partir de muestras de campo y se obtuvieron los amplificados esperados para MG (Figura 2-1) y de 300 pb para MS1 (Figura 2-2) y de 450 pb para MS2 (Figura 2-3). De igual forma, se confirmó el amplificado de 61 pb del *housekeeping* celular en la totalidad de las muestras procesadas (Figura 2-4)

**Figura 2-1:**Amplificados de *mgc2*. Líneas: 1. MP<sup>2</sup> Flecha 300 pb; 2. CP<sup>3</sup>; 3. CN<sup>4</sup> 4. a 20. MC<sup>5</sup>



Del total de 193 muestras procesadas, 93 fueron positivas para MG y 135 fueron positivas para MS (Figura 2-6). Del total de las muestras, el 75.1 % provenían de GPC y el 24.9 % eran de GRP. En relación a la ubicación de las muestras por departamento, el 74.6 % provenían de Cundinamarca y el 25.4% provenían de Boyacá.

<sup>2</sup> MP: Marcador de Peso

<sup>3</sup> CP: Control positivo

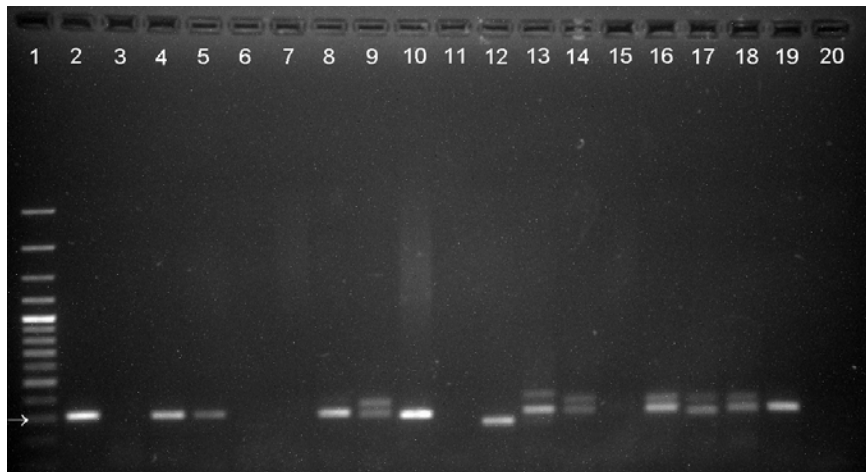
<sup>4</sup> CN: Control negativo

<sup>5</sup> MC: Muestras de campo

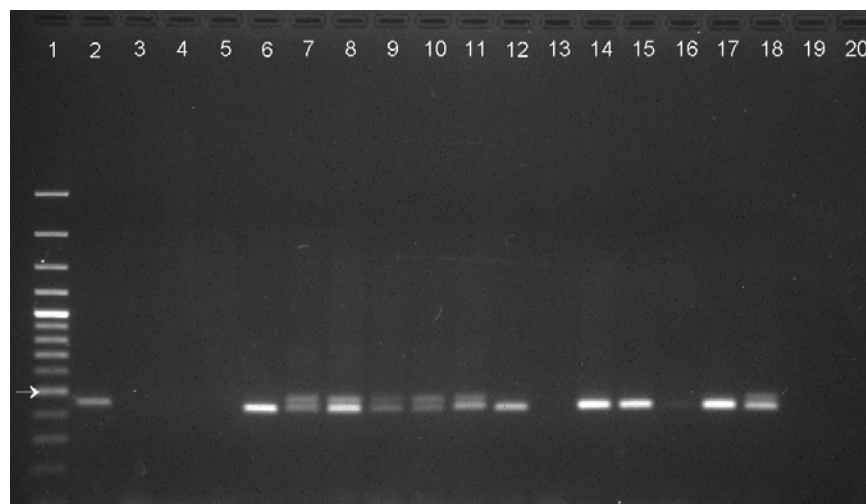
Con los primers de MS1 y MS2 se encontró amplificadas de una única banda en 82 muestras, dos bandas en 50 muestras y tres bandas en tres muestras. Ambos primers detectaron el mismo número de bandas en las mismas muestras, es decir que no hubo diferencias en los porcentajes de positividad detectados por los dos primers.

Cada uno de los juegos de primers de MG, MS1 y MS 2 solo amplificó el ADN específico en las pruebas de sensibilidad para cada una de las reacciones, no se observaron reacciones cruzadas en ninguno de los casos

**Figura 2-2:**Amplificados de *vlhA* MS1. Líneas: 1. MP Flecha 300 pb; 2. CP; 3. CN; 4 a 20.MC

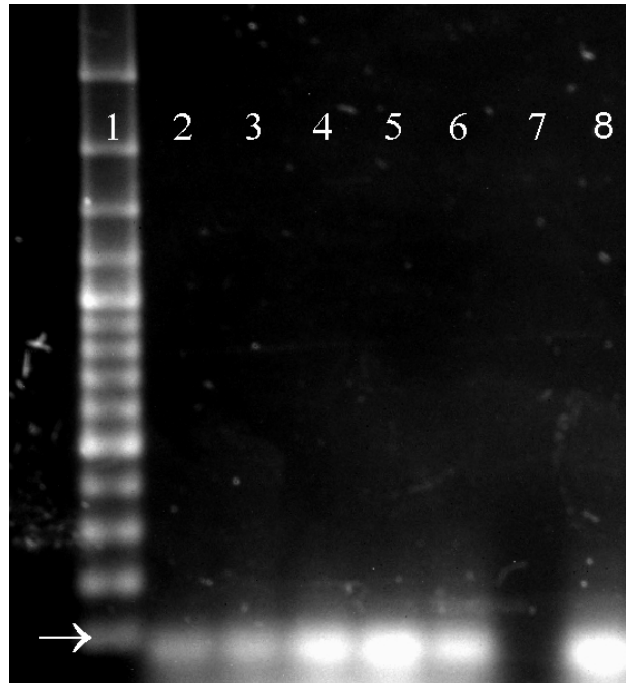


**Figura 2-3:**Amplificados de *vlhA* MS2. Líneas: 1. MP Flecha: 500 pb; 2. CP; 3. CN; 4. a 20. MC

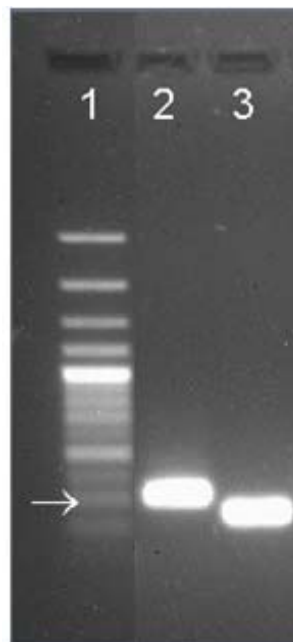


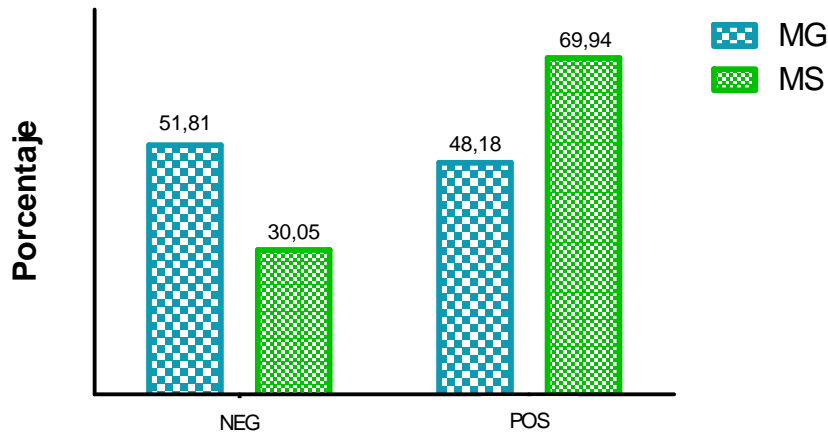


**Figura 2-4:** Amplificados de 28S *Gallus gallus* Líneas: **1.** MP Flecha 100 pb; **2 a 6.** MC; **7.** CN; **8.** CP



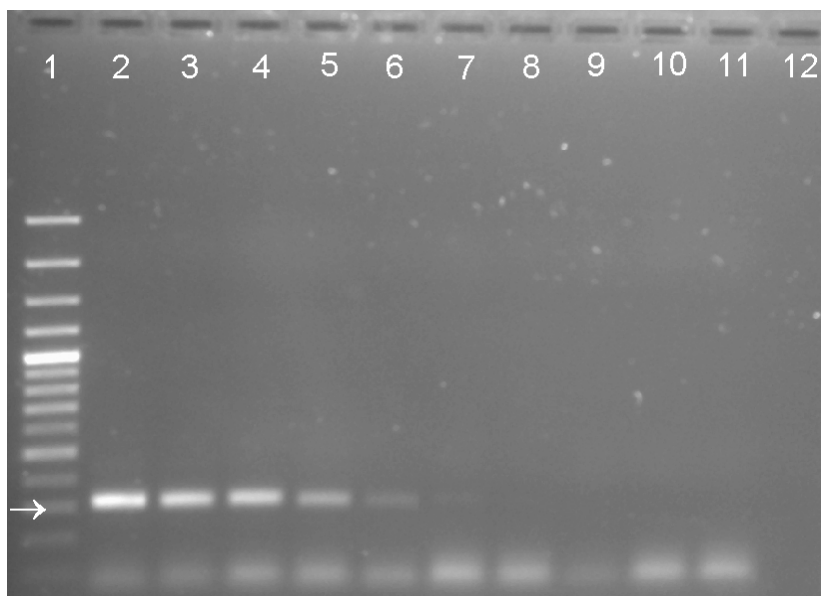
**Figura 2-5:** Controles de MG. Líneas: **1.** MP Flecha 300 pb; **2.** Cepa F de 300 pb; **3.** Cepa 6/85 de 237 pb.



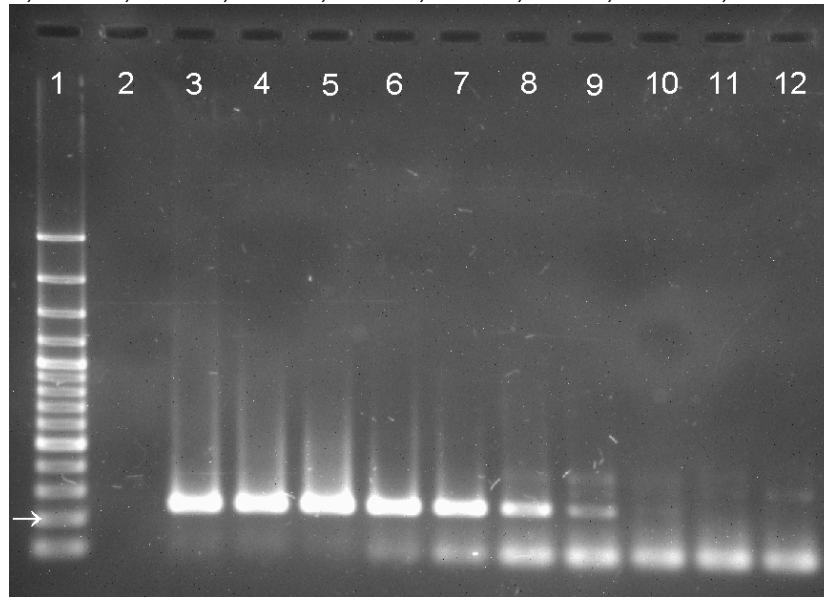
**Figura 2-6:** Positividad a MG y MS del muestreo total

n: 193

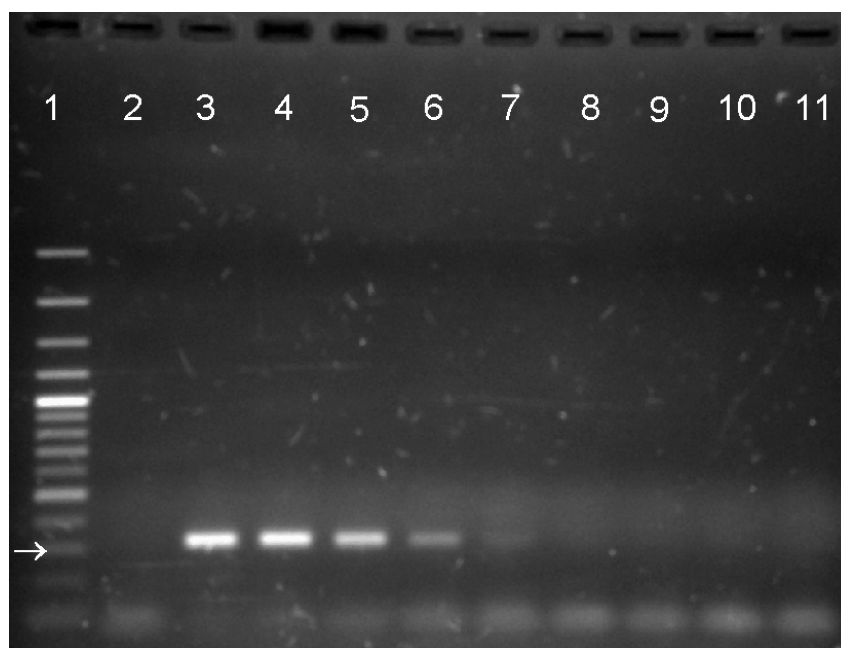
La sensibilidad relativa para cada uno de los controles usados en las PCR se muestra en la, Figura 2-7, Figura 2-8 y Figura 2-9. Para el caso de MG cepa F el nivel de detección estuvo en  $10^{-4}$ , para la Cepa 6/85 estuvo en  $10^{-6}$ , para MS1 y MS2 Cepa WVU1853 en  $10^{-3}$ , lo cual equivale a 1,64 pg, 0,1155 pg, 25,1 pg respectivamente, esto teniendo en cuenta que si el ADN genómico de un micoplasma es 1000 kb, una célula de micoplasma tendrá el equivalente a 1 fg de ADN genómico (Raviv, 2002) citado por (Hammond et al., 2009).

**Figura 2-7:** Sensibilidad relativa del control MG Cepa F. Líneas: 1. MP Flecha 300 pb; 2. Puro 3.  $10^{-1}$ ; 4.  $10^{-2}$ ; 5.  $10^{-3}$ ; 6.  $10^{-4}$ ; 7.  $10^{-5}$ ; 8.  $10^{-6}$ ; 9.  $10^{-7}$ ; 10.  $10^{-8}$ ; 11.  $10^{-9}$ ; 12. CN

**Figura 2-8:**Sensibilidad relativa del control MG Cepa 6/85. Líneas: 1. MP Flecha 200 pb; 2. CN; 3. Puro; 4.  $10^{-1}$ ; 5.  $10^{-2}$ ; 6.  $10^{-3}$ ; 7.  $10^{-4}$ ; 8.  $10^{-5}$ ; 9.  $10^{-6}$ ; 10.  $10^{-7}$ ; 11.  $10^{-8}$ ; 12.  $10^{-9}$



**Figura 2-9:**Sensibilidad relativa del control MS Cepa WVU1853. Líneas: 1. MP Flecha 300 pb; 2. CN; 3. Puro; 4.  $10^{-1}$ ; 5.  $10^{-2}$ ; 6.  $10^{-3}$ ; 7.  $10^{-4}$ ; 8.  $10^{-5}$ ; 9.  $10^{-6}$ ; 10.  $10^{-7}$ ; 11.  $10^{-8}$



La presentación de positividad a MG y MS por tipo de explotación (GPC y GRP), mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) (Tabla 2-4).

**Tabla 2-4:** Distribución de la positividad a MG y MS por tipo de explotación

	<b>MG</b> <b>Frecuencia</b>	<b>MG</b> <b>%</b>	<b>MS</b> <b>Frecuencia</b>	<b>MS</b> <b>%</b>
<b>GPC</b>	83/145	57.2 <sup>a</sup>	113/145	77.9 <sup>a</sup>
<b>GRP</b>	10/48	20.8 <sup>b</sup>	22/48	45.8 <sup>b</sup>

n: 193 <sup>a, b</sup> Letras diferentes en las columnas representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

Las GPC estaban ubicadas entre los 286 msnm y los 2780 msnm y las GRP estaban entre los 1010 msnm y los 2572 msnm. Este factor no presentó diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ) en cuanto a la presentación de positividad a MG y MS en los dos tipos de explotación estudiados.

En relación al tamaño de los lotes muestreados, en el grupo de GPC se encontraron tamaños de lotes desde 1000 aves hasta 121.380 aves y en el grupo de GRP entre 770 aves hasta 36.300 aves. No hubo diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ) para este factor y la presentación de positividad a MG y MS en los dos tipos de explotación.

Por otro lado se encontró que el número de lotes o aves de diferentes edades presentes en las GPC estaba entre uno y diez lotes, mientras que en el grupo de GRP se encontraban un máximo tres lotes en la misma granja. Para las GPC no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) relacionadas con la presentación de positividad a MS pero si hubo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para la presentación de MG (**Tabla 2-5**), mientras que para las GRP este factor no presentó diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ ) para ninguno de los agentes.

Un total de 51 muestras (35.2 %) de las GPC y de las GRP correspondían a lotes que habían recibido una dosis de vacuna viva de MG en algún momento de la vida del lote. En ninguno de los casos se reportó el uso de ningún tipo de vacuna de MS. No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre el uso de vacunas de MG y la presentación de positividad a MG y MS.

**Tabla 2-5:** Distribución de positividad a MG por número de lotes en GPC

<b>Numero de Lotes</b>	<b>MG Frecuencia</b>	<b>MG %</b>
1	16/39	41 <sup>a</sup>
2	20/30	66.7 <sup>c</sup>
3	11/18	61.1 <sup>c</sup>
4	11/20	55 <sup>c</sup>
5	7/10	70 <sup>c</sup>
6	15/18	83.3 <sup>b</sup>
10	3/10	30 <sup>a</sup>

n: 145 <sup>a,b,c</sup> Letras diferentes en las columnas representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

En cuanto a las medidas sanitarias o de bioseguridad establecidas en las explotaciones de estudio, se clasificaron las granjas en dos grupos; las que cumplen como granjas bioseguras y las que no cumplen. Para este fin se tuvieron en cuenta el cumplimiento total de 6 parámetros como son: la presencia de baños para el ingreso a las granjas, sistemas de desinfección de vehículos, dotaciones para los trabajadores y visitantes de las granjas, sistemas de compostaje de la mortalidad, sistema para el tratamiento de aguas y control de roedores e insectos. Bajo este parámetro se encontró que el 100 % de las GRP cumplían con la totalidad de las normas, mientras que en las GPC solo cumplían en el 61.8 % (89/145) de los casos, pero no hubo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre este factor y la presentación de positividad a MG y MS.

Para la distribución de positividad a MG y MS por razas de gallinas en los dos tipos de explotación, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) Ver Tabla 2-6 y Tabla 2-7

**Tabla 2-6:** Distribución de positividad a MG y MS por raza en GPC

<b>Raza</b>	<b>MG Frecuencia</b>	<b>MG %</b>	<b>MS Frecuencia</b>	<b>MS %</b>
<b>Isa Brown</b>	28/50	56 <sup>b</sup>	38/50	76 <sup>b</sup>
<b>Hy-line Brown</b>	40/55	72.7 <sup>a</sup>	50/55	90.9 <sup>a</sup>
<b>Lohmann Brown</b>	12/30	40 <sup>b</sup>	19/30	63.3 <sup>b</sup>
<b>Lohmann LSL</b>	2/5	40 <sup>b</sup>	3/5	60 <sup>b</sup>
<b>Otras</b>	1/5	20 <sup>c</sup>	3/5	60 <sup>b</sup>

n: 145 <sup>a,b,c</sup> Letras diferentes en las columnas representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

Las variables departamento y tipo de instalación, no mostraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) con la presentación de positividad a MG y MS en las GPC. (Tabla 2-8. El 100 % de las GRP tienen instalaciones de piso.

**Tabla 2-7:** Distribución de positividad a MG y MS por raza en GRP

Raza	MG		MS	
	Frecuencia	MG %	Frecuencia	MS %
<b>Ross</b>	1/23	4.34 <sup>a</sup>	9/23	39.1 <sup>a</sup>
<b>Cobb</b>	9/25	36 <sup>b</sup>	13/25	52 <sup>a</sup>

n: 48<sup>a, b</sup> Letras diferentes en las columnas representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

**Tabla 2-8:** Distribución de la positividad a MG y MS en GRP por tipo de instalación

	MG		MS	
	Frecuencia	MG %	Frecuencia	MS %
<b>Piso</b>	63/111	56.8	87/111	78.4
<b>Jaula Automatizada</b>	11/16	68.8	13/16	81.3
<b>Jaula Tradicional</b>	9/18	50	13/18	72.2

n: 145

Para facilitar el análisis del factor edad en la presentación de MG y MS, se consideraron cuatro grupos etéreos: I: 0-20 semanas, II: 21-40 semanas, III: 41-60 semanas y IV: mayor a 61 semanas. Se encontró que en ambos tipos de explotación hubo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Ver Tabla 2-9 y Tabla 2-10

Igualmente, se encontró la presencia de infecciones mixtas por MG y MS, en el 55.2 % (80/145) de las muestras de GPC y en el 8.3 % (4/48) de las muestras de GRP.

La distribución de las infecciones mixtas por grupo etéreo de edad para las GPC y GRP se muestran en la Tabla 2-11

**Tabla 2-9:** Distribución de la positividad a MG y MS en GPC por grupo etéreo

Edad	MG Frecuencia	MG %	MS Frecuencia	MS %
<b>0-20 semanas</b>	3/24	12.5 <sup>a</sup>	3/24	12.5 <sup>a</sup>
<b>21-40 semanas</b>	22/39	56.4 <sup>b</sup>	34/39	87.1 <sup>b</sup>
<b>41-60 semanas</b>	32/43	74.4 <sup>b</sup>	39/43	90.7 <sup>b</sup>
<b>Mayor a 61 semanas</b>	26/39	66.7 <sup>b</sup>	37/39	94.9 <sup>b</sup>

n: 145 <sup>a, b</sup> Letras diferentes en las columnas representan diferencias significativas (p<0.05)

**Tabla 2-10:** Distribución de la positividad a MG y MS en GRP por grupo etéreo

Edad	MG Frecuencia	MG %	MS Frecuencia	MS %
<b>0-20 semanas</b>	3/18	16.7	2/18	11.1 <sup>a</sup>
<b>21-40 semanas</b>	3/16	18.8	7/16	43.8 <sup>b</sup>
<b>41-60 semanas</b>	4/12	33.3	12/12	100 <sup>c</sup>
<b>Mayor a 61 semanas</b>	0/2	0	1/2	50 <sup>b</sup>

n: 48 <sup>a, b, c</sup> Letras diferentes en las columnas representan diferencias significativas (p<0.05)

**Tabla 2-11:** Distribución de positividad mixta en GPC y GRP por grupo etéreo

Edad	GPC Frecuencia	GPC %	GRP Frecuencia	GRP %
<b>0-20 semanas</b>	2/80	2.5 <sup>a</sup>	0/4	0 <sup>a</sup>
<b>21-40 semanas</b>	21/80	26.3 <sup>b</sup>	0/4	0 <sup>a</sup>
<b>41-60 semanas</b>	28/80	35 <sup>b</sup>	4/4	100 <sup>b</sup>
<b>Mayor a 61 semanas</b>	29/80	36.2 <sup>b</sup>	0/4	0 <sup>a</sup>

n: 84 <sup>a, b</sup> Letras diferentes en las columnas representan diferencias significativas (p<0.05)

## 2.6 Discusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio confirman una alta presencia de MG y MS en GPC y GRC de la zona centro del país, lo cual puede estar generando pérdidas económicas de alto impacto por caídas en la producción de huevos comerciales, las cuales han sido estimadas hasta en un 10 % de la producción total en diferentes estudios (Borges et al., 1999) y a las pérdidas por selección de la progenie de las reproductoras a nivel de las incubadoras (Nascimento et al., 2009).

La presentación de positividad a ambos agentes mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para ambos tipos de explotación, siendo las GPC las que presentaron el mayor porcentaje de positividad para ambos agentes, explicado tal vez por factores que también fueron estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) como los lotes múltiples en las granjas y la edad de las aves, lo cual ha sido descrito como factores asociados a la presentación de MG y MS (Kleven, 2008). La transmisión horizontal de la infección de las aves de mayor edad a las de menor edad ha sido ampliamente reportada a través de casos de campo y de manera experimental (Feberwee et al., 2005)

Igualmente, debido al alto porcentaje de presentación de ambos agentes en las GRP en la etapa de producción, puede considerarse un factor de gran importancia en cuanto a la posibilidad de la transmisión vertical de los agentes a la progenie, ya que se sabe que los micoplasmas son capaces de sobrevivir a todo el proceso de incubación (Ruiz, 2003), por lo que es importante realizar estudios de tipo vertical donde se involucren las aves de la progenie (pollo de engorde) y de esta manera poder entender mejor las dinámicas de las infecciones en el campo además de poder determinar si la presentación de la micoplasmosis es por transmisión vertical de las madres a la progenie o adquirida directamente en las granjas (Bencina et al., 2005).

La diferencia en la presentación de positividad en los dos tipos de explotación con relación a los grupos etáreos puede estar asociado directamente al tiempo que requiere la bacteria para infectar las aves en las granjas en los diferentes ciclos y tipos de producción (Kleven, 2000).



Actualmente en Colombia, en las granjas avícolas no se usan vacunas vivas de MS y solo unas pocas emplean bacterinas, por lo cual los altos porcentajes de positividad encontrados en este estudio deben corresponder a infecciones de campo. Esta situación requiere de un análisis y estudios posteriores buscando asociar la presentación del agente no solo a los problemas respiratorios con los cuales normalmente se asocia sino a la presentación de problemas articulares y locomotores (Lockaby et al., 1999; Jordan, 1975) podrían deberse a la presencia específica de MS en las granjas, así como en el caso de las GRP donde también se debe hacer estudios que involucren a las progenies.

La presencia de dos bandas en 50 muestras y de tres bandas en tres muestras deben corresponder a amplificados de igual número de cepas de MS para cada caso, situación que ha sido asociada al polimorfismo de tamaño de algunas cepas de MS y que ha sido observada solo en muestras de campo (Wetzel et al., 2010), es decir que correspondería a infecciones múltiples del mismo patógeno en las aves, por lo cual se recomienda hacer estudios posteriores, tales como la qPCR y secuenciación de cada producto, orientados a la diferenciación y caracterización de estas cepas, así como a establecer la implicación que estas infecciones múltiples pueden tener en los directamente en los parámetros productivos.

En cuanto al manejo de las infecciones por micoplasmas a nivel del campo, es importante considerar que la presentación de infecciones de MG o MS solos o en infecciones mixtas, puede representar una complicación para el manejo farmacológico de las mismas, puesto que el uso de antimicoplásmicos específicos estaría contraindicado en aquellas granjas donde la presencia de MG sea de origen vacunal debido a que uno de los objetivos del uso de vacunas vivas es el desplazamiento de las cepas de campo y el establecimiento de las cepas vacunales en las granjas (Kleven, 2005).

Con relación a estudios que han empleado la técnica de PCR en nuestro país, recientemente se ha reportado un 17.4 % de positividad a MG en ponedoras comerciales del departamento de Antioquia (Borja et al., 2009), y un 54 % de positividad a MG y un 69.6 % a MS en ponedoras del centro del país que presentaron problemas respiratorios (Ventura et al., 2012). El fuerte contraste en los resultados obtenidos en las dos zonas, puede deberse a la diferencia en los sistemas de producción, así como al uso o no de

vacunas vivas de MG en las diferentes granjas. Por otro lado, en este trabajo no se reporta la situación de MS, por lo cual es importante realizar estudios que involucren ambos agentes en las diferentes zonas del país.

Aunque en el presente trabajo se encontró para los dos tipos de explotación positividad a ambos agentes de manera individual y mixta a edades muy tempranas, es claro que las infecciones van aumentando con el tiempo, es decir que las infecciones se dan de manera progresiva desde la etapa de levante hasta la fase de producción, sin embargo, se recomienda hacer estudios lineales en el tiempo para lograr evaluar las infecciones en las diferentes edades de los lotes. Este comportamiento podría estar asociado al mejor estatus sanitario de las granjas en las fases de levante de las aves, si se tiene en cuenta que es una práctica común en la industria el usar instalaciones de cría y levante separadas de las áreas de producción en el caso de ponedoras y condiciones "todo adentro todo afuera" <sup>6</sup> en el caso de reproductoras, lo cual garantiza procesos de limpieza y bioseguridad mayores.

Del mismo modo, la detección temprana del patógeno mediante las pruebas de PCR puede ser de gran ayuda para establecer las medidas de control necesarias para evitar los efectos negativos de la micoplasmosis en las explotaciones avícolas.

## 2.7 Recomendaciones

Para poder conocer más sobre la dinámica de la infección por MG y MS en las granjas se deben llevar a cabo estudios que involucren todas las etapas de producción en los diversos tipos de explotación y asociarlo a los diferentes manejos, como son las densidades y número de lotes de aves en las granjas, los tiempos de descanso o vacío sanitario de las mismas y los sistemas de producción (automáticos o manuales).

Se sugiere llevar a cabo pruebas de diferenciación molecular como la RPFL a las muestras positivas de MG, con el fin de determinar si los patrones obtenidos

---

<sup>6</sup> Práctica zootécnica en la que se mantienen en la misma granja un solo grupo de aves desde que las aves tienen un día de edad hasta cuando terminan su ciclo de producción

corresponden a las cepas empleadas en la producción de las vacunas que actualmente se están usando en el país o si muestran un patrón diferente compatible con cepas de campo (Kempf, 1998).

Para las muestras de MS que presentaron más de una banda es recomendable hacer la secuenciación de cada una de ellas para verificar si realmente se trata de infecciones mixtas de más de una cepa de MS en el mismo lote de aves.

Así mismo es importante llevar a cabo estudios similares en otras regiones del país para poder conocer la situación de estos agentes en los diferentes sistemas de explotación comercial a nivel nacional.

## Bibliografía

BENCINA, D. Mycoplasma Infections. Biotechnical Faculty University of Ljubjana , 1-11. 2009.

BENCINA, D.; NARAT, M.; BIDOVEC, A.; ZORMAN-ROJS, O. Transfer of maternal immunoglobulins and antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* to the allantoic and amniotic fluid of chicken embryos. Avian Pathol 34 (6), 463-472. 2005.

BORGES, F.; GODOY, A.; VALLE, A. Disminución en la producción de huevos por micoplasmosis en granjas del estado de Aragua. Zootecnia Trop 17, 261-276. 1999.

BORJA, JV.; OLIVERA, M.; MONTOYA, F.; GONZÁLEZ, C.; HERRERA, A. Diagnóstico por PCR de *Mycoplasma gallisepticum* en sistemas de producción de huevo de mesa en el departamento de Antioquia. Rev Colomb Cienc Pec 22 (3), 479. 2009.

BROWNING, G.; MARKHAN, P. Determination of the Genomic Sequence of *Mycoplasma Gallisepticum*. 1-13. 2004. Rural Industries Research and Development Corporation.

BUTCHER, G. *Mycoplasma gallisepticum* - A Continuing Problem in Commercial Poultry. University of Florida, 2002.

COLMENARES, M., LATORRE, S. Determinación serológica de anticuerpos contra micoplasmas patógenos, *Salmonella pullorum* y presencia de anticuerpos vacunales de Newcastle en reproductores. Universidad del Tolima. 1987.

FEBERWEE, A.; DIJKSTRA, J.; BANNISEHT-WYSMULLER, T.; GIELKENS, A.; WAGENAAR, J. Genotyping of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* by Amplified Fragment Length Polymorphism analysis and digitalized Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis. Vet. Microbiol. 111, 125-131. 2005.

FEBERWEE, A.; BANNISEHT-WYSMULLER, T.; VERNOOIJ, J.; GIELKENS, A.; STEGEMAN, JA. The effect of vaccination with a bacterin on the horizontal transmission of *Mycoplasma gallisepticum*. Avian Pathol 35 (1), 35-37. 2006.

FENAVI. Censo Nacional Avícola. [www.fenavi.org](http://www.fenavi.org). 2009.

GARCÍA, M.; IKUTA, N.; LEVISOHN, S.; KLEVEN, S. Evaluation and Comparison of Various PCR Methods for Detection of *Mycoplasma gallisepticum* Infection in Chickens. *Avian Dis* 49 (1), 125-132. 2005.

HAMMOND, P.; RAMIRES, A.; MORROW, C.; BRADBURY, J. Development and evaluation of an improved diagnostic PCR for *Mycoplasma synoviae* using primers located in the haemagglutinin encoding gene *vlhA* and its value for strain typing. *Vet. Microbiol.* 136, 61-68. 2009.

HONG, Y; GARCÍA, M.; LEITING, V.; BENCINA, D.; DUFOUR-ZABALA, L.; ZAVALA, G.; KLEVEN, S. Specific detection and typing of *Mycoplasma synoviae* strains in poultry with PCR and DNA sequence analysis targeting the hemagglutinin encoding gene *vlhA*. *Avian Dis* 48, 606-616. 2004

HERNÁNDEZ, Y.; LOBO, E.; MARTÍNEZ, S.; ZAMORA, L. Evaluación de diferentes métodos de extracción de ADN de micoplasmas para su empleo en el diagnóstico por PCR. *Rev Salud Anim.* 31[2], 108-114. 2009.

JORDAN, F. Avian mycoplasma and pathogenicity - A review. *Avian Pathol* 4 (3), 165-174. 1975.

KEMPF, I. DNA amplification methods for diagnosis and epidemiological investigations of avian mycoplasmosis. *Avian Pathol* 27 (1), 7-14. 1998.

KLEVEN, S. Control of avian *Mycoplasma* infections in commercial poultry. *Avian Dis.* 52, 367-374. 2008.

KLEVEN, S. Micoplasmosis. In: Calneck BW, editor. *Enfermedades de las Aves*. 2 ed. Manual Moderno; 195-239, 2000.

KLEVEN, S. Prevention and control of avian mycoplasmas. *Avian Insight* 2 (5), 1-3. 2005.

LEY, D.; BERKHOFF, J.; LEVISOHN, S. Molecular Epidemiologic Investigations of *Mycoplasma gallisepticum* Conjunctivitis in Songbirds by Random Amplified Polymorphic DNA Analyses. 3 (3). *Emerging Infectious Diseases*, 1997

LOCKABY, S.; HOERR, F.; LAUERMAN, L.; SMITH, B.; SAMOYLOV, A.; TOIVIO-KINNUCAN, M. Factors Associated with Virulence of *Mycoplasma synoviae*. Avian Dis 43, 251-261. 1999.

NASCIMENTO, E.; PEREIRA, V.; NASCIMENTO, M.; BARRETO, M. Avian Mycoplasmosis Update. Braz J Poult Sci 7 (1), 1-9. 2009.

OIE. Micoplasmosis Aviar - *Mycoplasma gallisepticum*. OIE, editor. Manual de la OIE sobre animales terrestres. 905-919. 2004.

OIE. Micoplasmosis aviar (*Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*). OIE, editor. Manual OIE sobre animales terrestres. 1-17. 2008.

RUIZ, J. Actualidades en el manejo y control de la micoplasmosis aviar. XXIV Seminario Avícola Internacional AMEVEA. 2003.

SANCHEZ, B.; REDONDO, H.; BRANDY, L.; MARTÍNEZ, A.; RODRIGUEZ, M. Detección de cepas de *Mycoplasma gallisepticum* por PCR a tiempo real sobre los genes LP y *mgc2*, en swabs traqueales con PBS y medio Frey. XLII Symposium Científico de Avicultura, 2005.

SUZUKI, K.; OKADA, H.; ITOH, T.; TADA, T.; MASE, M.; NAKAMURA, K. Association of increased pathogenicity of Asian H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses in chickens with highly efficient viral replication accompanied by early destruction of innate immune responses. J. Virol 83 (15), 7475-7486. 2009.

URIBE, A. Diagnóstico y control de la micoplasmosis aviar. XXVII Seminario Avícola Internacional. AMEVEA, 2006.

VENTURA, C.; RAMIREZ, G.; VERA, V. Detección y diferenciación de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* mediante la técnica de PCR a partir de hisopos traqueales de aves con síntomas respiratorios. Acta biol. Colomb. 17[3], 525-536. 2012.

WETZEL, A.; LEFEVRE, K.M.; RAVIV, Z. Revised *Mycoplasma synoviae* *vlhA* PCRs. Avian Dis 54 (4), 1292-1297. 2010.

## **3. Diferenciación molecular por PCR-RFLP de *Mycoplasma gallisepticum* obtenido de hisopos traqueales**

### **3.1 Resumen**

Se normalizó la técnica de PCR-RFLP para definir los patrones de restricción generados en productos de PCR positivos de *Mycoplasma gallisepticum* (MG) por la acción de la endonucleasa *HaeIII* con el fin de diferenciar las cepas vacunales (Cepa F) de las cepas de campo y de referencia (cepa R).

Para determinar los sitios de corte de la enzima *HaeIII*, se realizaron ensayos virtuales para los productos de PCR del gen *mgc2* para las vacunas Cepa F y 6/85 y como referencia de las cepas de campo se usó la secuencia de la cepa R obtenida de las bases de datos. El gen *mgc2* de MG permite la diferenciación directa de la cepa 6/85 y de otras cepas de MG, ya que para esta se obtiene un producto de 237 pb y para las otras cepas el producto es de 300 pb.

En total se determinaron tres sitios de corte para la cepa F que generaron fragmentos de 157, 63, 53 y 31 pb, dos para la cepa 6/85, con fragmentos de 183 y 53 pb y dos para la cepa R, con fragmentos de 248 y 52 pb. Estos sitios teóricos de corte fueron confirmados en el laboratorio. Del total de muestras de campo se obtuvo una banda de 300 pb, ninguna muestra presentó la banda de 237 de la cepa 6/85.

Para un total de 93 muestras de campo analizadas, procedentes de granjas de ponedoras comerciales (GPC) y granjas de reproductoras pesadas (GRP), se determinaron dos patrones RFLP, un patrón 1 o de cepa F y un patrón 2 o de cepa R. La presentación de cada uno de ellos fue de 39.8 % y de 60.2 % respectivamente.

No se encontraron diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ ) entre los dos patrones RFLP y variables medioambientales y de manejo asociados a las muestras como la altitud, la edad de los lotes, el número de lotes en las granjas y el tamaño de los lotes para los dos tipos de explotación.

La presentación del patrón 2 en las GPC mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para el tipo de instalación, siendo mayor para las aves alojadas en piso.

De las 31 muestras con historia de vacunación con Cepa F en las GPC, solo el 42 % presentó el patrón 1 y el 58 % mostró el patrón 2. Igualmente de un total de 52 muestras que reportaron no haber vacunado, se encontró en un 28.8 % la presencia del patrón 1, mientras que para las GRP la totalidad de muestras con historia de vacunas presentaron el patrón 1.

### 3.2 Abstract

In order to establish a method to differentiate vaccine F strain from *Mycoplasma gallisepticum* (MG) field strains a PCR-RFLP was normalized using the *HaeIII* endonuclease in the PCR product of *mgc2* gen. PCR of the *mgc2* gene is capable of directly differentiate the 6/85 strain from other MG strains. Virtual assays showed the cutoff points and length fragments for MG F strain, MG 6/85 strain and R strain. Four fragments, sizes 157, 63, 53 and 31 pb were obtained for the F strain, two fragments, one of 183 and other of 53 pb for the 6/85 strains and two fragments, one of 248 and other of 52 pb for the R strain were observed. Any of the samples showed PCR amplicon corresponding to 237 pb for 6/85 strain. A total of 93 samples from layer farms (GPC) and breeder farms (GRP) were processed and resulting in two defined RFLP patterns: one named pattern 1 corresponding to F strain which was founded in 39.8 % of the samples and the second, pattern 2 or field strain pattern, which was found in 60.2 % of cases. The relation between the patterns and environmental and management variables didn't showed statistically significant differences ( $p > 0.05$ ).

The presentation of pattern 2 in GPC showed significant differences ( $p < 0.05$ ) between production systems. In the GPC from 31 samples with a history of vaccination with F strain, 42% presented the pattern 1 and the remaining 58%



showed pattern 2. On the other hand, from a total of 52 samples that reported no vaccination, pattern 1 was found in 28.8%, while for all GRP samples which had vaccine history the pattern 1 was present.

### 3.3 Introducción

La micoplasmosis aviar por MG continua siendo uno de los principales problemas de la avicultura moderna a nivel mundial. El aumento de las zonas o áreas avícolas y el manejo de centros de producción avícolas cada vez más intensivos contribuyen de manera importante a que sea aún más difícil el control de las enfermedades de tipo respiratorio en las granjas, por lo cual ha venido en aumento el uso de vacunas vivas de MG para disminuir al máximo la presentación de síntomas en las aves (Abd-El-Motelib & Kleven, 1993). La dificultad para el control y erradicación de la enfermedad en las granjas está relacionada entre otras razones con la capacidad de variación en la expresión de los mayores antígenos de superficie de MG de las cepas de campo, lo cual permite la persistencia del patógeno a pesar de presentarse respuestas inmunes fuertes en las aves (Kleven, 1998). Igualmente, la presencia de MG patógenos en los lotes de aves producen complicaciones debido a la interacción con otras especies de micoplasmas como el *Mycoplasma synoviae* (MS), con virus como virus de Newcastle (NDV) y el virus de la Bronquitis infecciosa aviar (VBI), y con bacterias como *E. coli.*, así como las condiciones medioambientales, entre las que se incluyen variables como la temperatura, la ventilación, niveles de amoníaco, entre otras (Kleven, 1998).

En la actualidad en el país se encuentra disponible en el mercado una vacuna viva de la cepa F de MG, la cual está siendo utilizada como una alternativa para el control de la enfermedad en GPC y GRP con el fin de disminuir el impacto negativo de la micoplasmosis en las granjas. Las pruebas serológicas utilizadas normalmente son útiles para medir la seroconversión cuando se usa alguna vacuna (Branton et al., 2010) y para definir la exposición de las aves a cepas de campo (Haghighi-Khoshkhoo et al., 2011; Colas et al., 2010; Nieves et al., 2010; Hossain et al., 2007; Asnani & Agarwal, 1974), pero no permiten la diferenciación de las cepas. Igualmente existe una variabilidad en las respuestas serológicas, como consecuencia de los continuos cambios en los perfiles antigénicos de los micoplasmas y por lo tanto en las respuestas humorales y celulares de las aves (Gaunson et al., 2006).

Existen reportes que permiten identificar cepas específicas de MG cuando son amplificadas los genes *16S*(Kiss et al., 1997), *PvpA*(Liu et al., 2001), *mgc1* o *gapA*(Kleven et al., 2004;Liu et al., 2001) y lipoproteína (*LP*) de MG (Sanchez et al., 2005b), a los cuales se les realiza la prueba de RFLP o secuenciación del producto de PCR para diferenciar cepas de campo de las de origen vacunal.

En el presente estudio, los productos del gen *mgc2* amplificados por PCR, se sometieron a digestión enzimática con la endonucleasa de restricción *HaeIII*, con el fin de diferenciar muestras de campo de muestras vacunales de MG.

## 3.4 Materiales y métodos

### 3.4.1 Ensayos virtuales Ensayos virtuales

Los sitios de corte y fragmentos teóricos generados por la acción de la enzima fueron obtenidos virtualmente en [www.insilico.es](http://www.insilico.es), usando en el análisis, las secuencias obtenidas de las vacunas de MG de las cepas F y 6/85 usadas como controles en el presente trabajo<sup>7</sup> y de la cepa R obtenidos del Genbank<sup>8</sup>. Ver Tabla 3-1

### 3.4.2 Muestras de estudio

Un total de 93 muestras de campo que previamente resultaron positivas por PCR del gen *mgc2*, fueron utilizadas para llevar a cabo el proceso de digestión de la endonucleasa *HaeIII*. Para poder comparar los patrones presentados en las muestras de campo comparado con los controles utilizados y su utilidad a nivel diagnóstico como prueba post-PCR, se hizo lectura de los controles y la totalidad de las muestras de campo por tres métodos: Agarosa al 1.5 %, Agarosa al 2.5 % y Poliacrilamida al 15 %.

---

<sup>7</sup>Las secuencias de las vacunas cepa F y cepa 6/85 se realizó en Macrogen ® (Macrogen USA®).

<sup>8</sup>[www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez)

### 3.4.3 Protocolo de amplificación de *M. gallisepticum*

Se amplificó un segmento de 300 pb para la cepa F y de 237 pb para la cepa 6/85 de MG usando primers previamente reportados por (García et al., 2005). Ver Tabla 3-2

El volumen final de cada reacción fue de 20 µl, y se usaron las siguientes volúmenes y concentraciones: 2 µl de buffer para PCR 10 X (Invitrogen® Buffer PCR 10 X), 0.52 µl de MgCl 50 mM (Invitrogen® MgCl 50 mM), 0.4 µl de nucleótidos a 10 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP Invitrogen®), 0.16 µl de primer F (50 µM Invitrogen®) y 0.16 µl de primer R (50 µM Invitrogen®), Taq Polimerasa 0.08 µl de 5 U (Invitrogen® Platinum DNA Taq Polimerasa 5u/µl), 1 µl de DMSO, 13.68 µl de agua y 2 µl de ADN.

El perfil térmico empleado fue: una denaturación inicial a 94 °C por 3 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 53 °C por 30 seg, 72 °C por 90 seg y una extensión final de 72 °C x 5 min, en un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient®

### 3.4.4 Protocolo de la digestión enzimática – RFLP

A los productos de amplificación obtenidos en el paso anterior, se les hizo tratamiento enzimático con la enzima *HaeIII* que tiene como sitio de reconocimiento la secuencia 5´ GGCC 3´. El volumen final por reacción fue de 20 µl, utilizando 15 µl del producto de PCR de MG y adicionando 5 µl de mastermix de la enzima que contenía los siguientes volúmenes y concentraciones: 2.4 µl de agua ultrapura (Gibco®), 0.2 µl de BSA (500 µg/ml New England BioLabs Inc®), 2 µl de NEBuffer4® (NEBuffer 4 10 X New England BioLabs Inc®) y 0.4 µl de *HaeIII* (10.000 units/ml New England BioLabs Inc®). El perfil térmico utilizado fue: 37 °C por 75 min y 80 °C por 10 min. Se empleó un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient®.

**Tabla 3-1:** Sitios teóricos de corte de *HaeIII* en la vacuna cepa F, vacuna cepa 6/85 y cepa R de MG

	Sitios de corte <i>HaeIII</i> en el gen <i>mgc2</i> de MG	Longitud de los Fragmentos
Cepa F <sup>9</sup>	TCGCAATTTGGTCCTAATCCCCAACAAAGAATTAATCCAC	
	AGGGTTTTGGT <b>GGCC</b> CAATGCCACCTAACCACATGGGG	31 pb
	ATGC <b>GGCC</b> AGGGTTTAACCAAATGCCGCCACAAATGGG	53 pb
	TGGGATGCCACCTAACCACATGGGGATGC <b>GGCC</b> AGGGT	63 pb
	TTAACCAAATGCCACCTAACCAAATGGGTGGAATGCCAC	157 pb
	CAAGACCAAACCTCCCTAACCAAATGCCTAATATGAATCA	
ACCAAGACCAGGTTTCAGACCACAACCTGGTGGTGGGG		
TCTCGATGGGAAATAAAGCTGGAGGTGGGTTTAA		
Cepa 6/85 <sup>10</sup>	TCGCAATTTGGTCCTAATCCCCAACAAAGAATTAACCCG	
	CAGGGCTTTGGT <b>GGCC</b> CAATGTCACTTAACCAAATGGGG	53 pb
	ATGCGACCAGGGTTTAACCAAATAGCCCCACAAATGGG	184 pb
	AGGAATAGCCACCAAGACCAAACCTCCCTAACCAAATAG	
	CCTAATATGAACCAACCAAGACCAGGTTTCAGACCACAA	
CCTGGTGGTGGGGCGCCGATGGGAAATAAAGCTGGAGG		
TGGG		
Cepa R <sup>11</sup>	CGCAATTTGGTCCTAATCCCCAACAAAGAATTAACCCAC	
	AGTGCTTTGGT <b>GGCC</b> CAATGCAACCTAACCAAATGGGAA	
	TGCGACCAGGGTTTAACCAAATGCCCCACAAATGGGA	
	GGAATGCCACCTAACCAAATGGGAATGCGACCAGGGTTT	52 pb
	AACCAAATGCCCCACAAATGGGAGGAATGCCACCAAG	248 pb
	ACCAAACCTCCCTAACCAAATGCCTAATATGAACCAACCT	
	AGACCAGGTTTCAGACCACAACCTGGTGGTGGGGTGCC	
	GATGGGAAATAAAGCTGGAGGTGGGTTTA	

**Tabla 3-2:** Primers de *mgc2* de MG

Primers	Secuencia	Producto
MG-F	5' CGCAATTTGGTCCTAATCCCCAACCA 3'	237pb - 300 pb
MG-R	5' TAAACCCACCTCCAGCTTTATTTCC 3'	

<sup>9</sup>Numero de acceso Genbank **AY556230.1**

<sup>10</sup>Numero de acceso Genbank **AY556231.1**

<sup>11</sup>Numero de acceso Genbank **AY556228.1**

### **3.4.5 Lectura de la prueba en gel de agarosa**

La electroforesis para evaluar los productos de la digestión fueron corridas en agarosa ultrapura (Invitrogen®) al 1.5 % y al 2.5 % en buffer TAE 1 X, en un equipo PowerPac HC® (Bio-Rad Laboratories®) a 85 V por 90 min y 100 V por 70 min respectivamente. Se usaron 5 µl del producto de la digestión y 1 µl de buffer de carga (6 X DNA Loading Dye Fermentas®). Para el revelado se usó inmersión del gel en una solución de 1 X GelRed® (GelRed Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X Biotium®) durante 15 minutos. Como marcador de peso molecular se emplearon el DNA GeneRuler 100 pb Plus® (Fermentas®) y el 20 bp Molecular Ruler® (Bio-Rad Laboratories®). La lectura se hizo en un fotodocumentador GelDoc-XR® (Bio-Rad Laboratories®) bajo luz ultravioleta. Para el análisis de los geles se usó el software Quantity One Analysis 1-D 4.6.3 ® (Bio-Rad Laboratories®)

### **3.4.6 Lectura de la prueba en gel de poliacrilamida**

Se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida al 15 % (Anexo 5) para evaluar los patrones de corte de la digestión, usando buffer TBE 1 X (Anexo 4), en un equipo Mini-Protean Tetra cell ® (Bio-Rad Laboratories®) a 100 V por 2:15 horas. Se pusieron en cada pozo del gel 5 µl del producto de la digestión y 2 µl de buffer de carga (6 X DNA Loading Dye Fermentas®). Como marcadores de peso molecular se empleó 1.5 µl de DNA GeneRuler 100 pb Plus® (Fermentas®) y 1.5 µl de 20 bp Molecular Ruler® (Bio-Rad Laboratories®).

### **3.4.7 Procedimiento de tinción de plata**

Se utilizó un protocolo modificado de (Sambrook & Russel, 2001) colocando el gel en un recipiente con la solución de fijación (Anexo 6) durante diez min en agitación permanente, seguido de un lavado con agua destilada y posterior inmersión del gel en la solución de plata al 0.3 % (Anexo 7) durante 15 min en agitación permanente, nuevamente se realizó un lavado con agua destilada y se pasó el gel a la solución de revelado (Anexo 8) y se dejó en agitación permanente hasta que empezaran a aparecer las bandas. Una vez las bandas tenían la intensidad deseada se puso el gel en la solución de detención (Anexo 6) y posteriormente se dejó el gel durante una hora en una solución de inmortalización (Anexo 9).

### 3.4.8 Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se realizó una estadística descriptiva para las diferentes variables y se analizaron los datos mediante pruebas correlación de variables como el chi cuadrado y pruebas de regresión logística, mediante el uso del software estadístico *Statistix 8.0*

## 3.5 Resultados

Del total de 93 muestras de campo que fueron positivas a MG, el 100 % tuvo un tamaño de 300 pb, es decir que ninguna presentó el tamaño de banda de 237 pb de la cepa 6/85 en el amplificado de la PCR. Sin embargo, se determinó el perfil RFLP para la cepa 6/85 vacunal, la cual fue igual a lo esperado según los ensayos virtuales.

Del total de muestras, el 39.8 % (37/93) tuvieron un patrón de corte igual al presentado por la vacuna cepa F (Patrón 1), en el cual se observan 4 bandas y el restante 60.2 % (56/93) tuvieron un patrón de corte que coincide con el corte de los ensayos virtuales de la *HaeIII* en la secuencias reportada de la cepa R (Patrón 2), en la cual se observan 2 fragmentos, uno de 52 pb y otro de 248 pb..

La distribución de presentación de los dos patrones RFLP de acuerdo al departamento no tuvo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) Ver Tabla 3-3.

**Tabla 3-3:** Distribución de patrones de restricción por departamento

Departamento	Patrón 1	Patrón 2
	38.2 %	61.8 %
Cundinamarca	29/76	47/76
	47 %	53 %
Boyacá	8/17	9/17

n: 93

La presentación de positividad de acuerdo al tipo de explotación presento diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) Ver Tabla 3-4

**Tabla 3-4:** Distribución de patrones de restricción por tipo de explotación

Tipo de Explotación	Patrón 1	Patrón 2
	33.7 % <sup>a</sup>	66.3 % <sup>a</sup>
GPC	28/ 83	55/83
	90 % <sup>b</sup>	10 % <sup>b</sup>
GRP	9/10	1/10

n: 93 <sup>a, b</sup> Letras diferentes en las columnas representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

En relación a la distribución de los patrones por razas, en las GRP, las 9 muestras con el patrón 1 eran aves Ross y la muestra que tuvo el patrón 2, era de aves Cobb. La distribución de los patrones de restricción en las GPC tuvo diferencias significativas y se presentan en la **Tabla 3-5**

La presentación de los dos patrones de restricción para cada uno de los tipos de instalación se muestran en la

Tabla 3-6, y mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

**Tabla 3-5:** Distribución de patrones de restricción por raza en GPC

Razas de ponedoras	Patrón 1	Patrón 2
Isa Brown	39.3 % <sup>a</sup> 11/ 28	30.9 % <sup>a</sup> 17/55
Hy-line Brown	39.3 % <sup>a</sup> 11/28	52.7 % <sup>b</sup> 29/55
Lohmann Brown	14.3 % <sup>b</sup> 4/28	14.5 % <sup>c</sup> 8/55
Lohmann LSL	7.1 % <sup>b</sup> 2/28	0 % 0/55
Otras	0 % 0/28	1.8 % <sup>c</sup> 1/55

n: 83 <sup>a, b, c</sup> Letras diferentes en las columnas representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

**Tabla 3-6:** Distribución de patrones de restricción por tipo de instalación en GPC

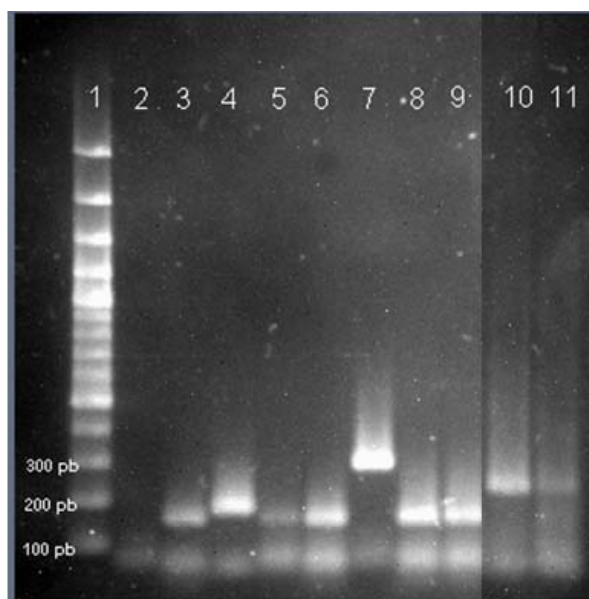
Tipo de Instalación	Patrón 1	Patrón 2
Piso	57.2 % <sup>a</sup> 16/28	85.5 % <sup>a</sup> 47/55
Jaula Tradicional	21.4 % <sup>b</sup> 6/28	5.4 % <sup>b</sup> 3/55
Jaula Automatizada	21.4 % <sup>b</sup> 6/28	9.1 % <sup>b</sup> 5/55

n: 83 <sup>a, b</sup> Letras diferentes en las columnas representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

### 3.5.1 Resultados en Agarosa al 1.5 %

El patrón de corte enzimático visualizado en el gel de agarosa al 1.5 % para la vacuna cepa F fue de una banda de 157 pb y una segunda banda de aproximadamente 60 pb y la vacuna cepa 6/85 mostro dos bandas, una de 184 y una de 53 pb. Ver Figura 3-1:

**Figura 3-1:**RFLP de MG en Agarosa 1.5 %. Líneas: **1.**MP;**2.** CN; **3.** Patrón Cepa F; **4.** Patrón cepa 6/85; **5.** MC; **6.**MC; **7.**Cepa F sin digestión; **8.** MC;**9.** MC; **10.** MC; **11.** MC

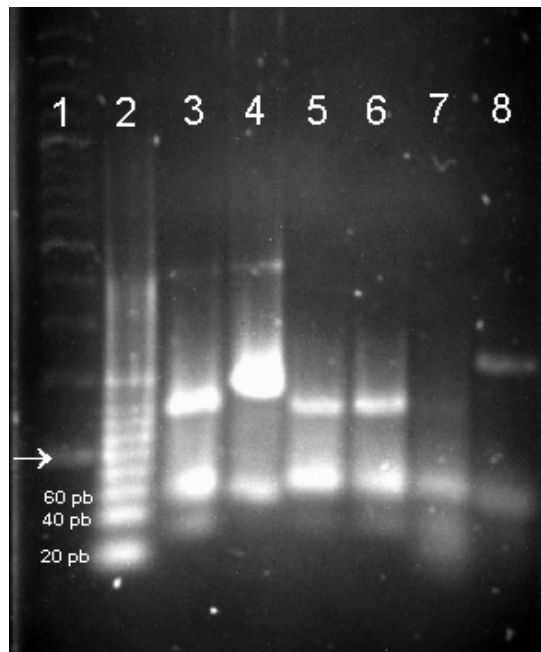




### 3.5.2 Resultados en Agarosa al 2.5 %

Al visualizar los mismos productos en los geles de agarosa de 2.5 % se visualizaron para la vacuna cepa F una banda de 157 pb, una banda de 60 pb y una de 31 pb y la vacuna cepa 6/85 mostro dos bandas, una de 184 y una de 53 pb. Ver Figura 3-2

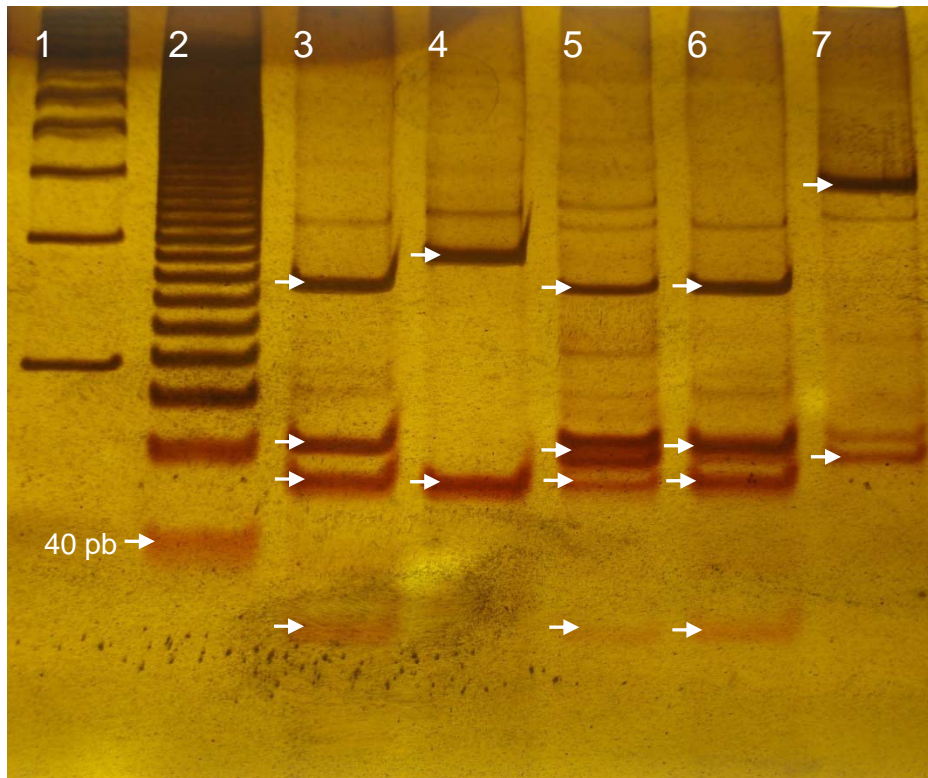
**Figura 3-2:**RFLP de MG en Agarosa 2.5 % Líneas: **1.** MP de 100 pb ; **2.** MP de 20 pb; **3.** Patrón Cepa F; **4.** Patrón Cepa 6/85; **5.**MC Patrón 1; **6.**MC Patrón 1; **7.** MC Patrón 1; **8.**MC Patrón 2



### 3.5.3 Resultados en poliacrilamida al 15 %

El revelado de los geles de poliacrilamida mostró para la vacuna cepa F una banda de 157 pb, una banda de 63 pb, una de 53 pb y una de 31 pb y la vacuna cepa 6/85 mostró dos bandas, una de 184 y una de 53 pb. El patrón de corte se presentó de acuerdo a lo esperado así como los fragmentos obtenidos. Ver Figura 3-3

Figura 3-3:RFLP de MG en Poliacrilamida al 15 %. Líneas: 1. MP de 100 pb; 2. MP de 20 pb; 3. Patrón 1 Cepa F; 4. Patrón Cepa 6/85; 5. MC Patrón 1 Cepa F; 6.MC Patrón 1 Cepa F; 7.MC Patrón 2 cepa de campo.



### 3.6 Discusión

El presente trabajo determinó la presencia de dos patrones de restricción definidos para productos de PCR a partir de una porción del gen *mgc2* digeridos con la endonucleasa *HaeIII*. El patrón 1 o patrón de la cepa F fue observado en el 39.8 % de las muestras y el patrón 2 o de Cepa R en el 60.2 %.

Se confirmaron los cortes RFLP teóricos para las cepas vacunales control (cepa F y cepa 6/85). En cuanto a los sistemas de lectura utilizados, estos fueron consistentes al compararlos entre sí, es decir que la lectura de agarosa estaría recomendada para fines diagnósticos rápidos y los geles de poliacrilamida para procesos de confirmación o para estudios posteriores.

No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) para variables como altitud, número de lotes en las granjas, edad de los lotes, departamento y nivel de bioseguridad con el tipo de patrón mostrado. Aunque hubo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las razas y el tipo de patrón encontrado, la significancia de este hallazgo no es clara en el presente estudio, por lo cual para realmente determinar si existe algún tipo de predisposición o resistencia genética es conveniente realizar estudios más específicos en este sentido.

Se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre las presentación de los dos patrones y la vacunación contra MG. En las GRP, para las 9 muestras que tuvieron el patrón 1 se reportó el uso de una vacuna de MG, y la muestra que mostro el patrón 2 no reporta su uso, contrario a esto en las GPC, se encontró que en el 28.8 % de muestras con el patrón 1 eran de granjas que no reportaron haber sido vacunadas, mientras que en aquellas muestras que reportaron usar la vacuna, solo el 42 % de las muestras presentó el patrón 1, y el 58 % mostró el patrón 2, lo cual estaría en desacuerdo del propósito de usar las vacunas vivas (Feberwee et al., 2006), el cual es establecer la cepa vacunal como la dominante en las granjas, aunque se sabe que una sola vacuna en una granja no logra este objetivo. Sin embargo, al analizar la procedencia de las muestras, se encontró que para algunas granjas multiedades, hubo resultados de patrón 1 y de patrón 2 para los diferentes lotes, tanto en granjas que reportan vacunación con cepa F como en aquellas que no la reportan, lo cual sería un claro indicador que en las granjas circulan al tiempo ambos tipos de bacterias. Un punto importante en este sentido es la calidad de la información obtenida de las granjas, ya que es puntual y no tiene en cuenta los historiales de vacunación, por lo cual se sugieren hacer trabajos de seguimiento con muestreos espaciados en el tiempo para determinar cuál es el comportamiento real de las infecciones por MG en aves vacunadas y aves no vacunadas.

Igualmente, la presencia del patrón 1 en aquellos lotes que no reportan el uso de vacunas, podría deberse al uso de cepas vacunales en lotes anteriores lo que generaría el establecimiento de esta como la cepa dominante en la granja. En este sentido, una de las vías de infección de las aves, es el ingreso de lotes libres a granjas que son positivas al patógeno, gracias a la habilidad que tienen los micoplasmas para permanecer por largos periodos de tiempo, haciendo posibles las infecciones nuevas (Buim et al., 2009).

Situaciones adicionales y de las cuales no tenemos información, son entre otras las vías y calidad de las aplicaciones (Branton et al., 2008); en este sentido está descrito que las aplicaciones en spray de vacunas de la cepa F de MG son poco uniformes y generan seroconversiones inconsistentes (Branton et al., 2010). Otro punto a considerar es el uso de antibióticos antimicoplásmicos específicos tiempo después de haber usado las vacunas, lo que podría haber afectado su establecimiento en las aves vacunadas.

El mayor porcentaje de GPC con presencia del patrón 2, puede estar asociado a que en este tipo de explotaciones existen manejos más intensivos, mayores densidades de aves, revacunaciones en producción y con menos presencia de medidas de bioseguridad como son el descanso de las granjas y depopulaciones totales (Buim et al., 2009), debido a que en su mayoría no hay granjas de una sola edad y normalmente la entrada de los nuevos lotes a las granjas se da cuando aún hay lotes de mayor edad en las mismas.

Las diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) encontradas para los dos patrones RFLP con relación al tipo de instalación, podría deberse al estrecho contacto que tienen las aves cuando están alojadas en piso, lo cual definitivamente puede aumentar la transmisión horizontal del MG, que para la situación del uso de la vacuna es ideal porque se lograría una mayor cobertura de la misma para todas las vías de aplicación (Whithear et al., 1996), mientras que en las jaulas no existe este contacto a pesar de tener mayores densidades de aves por área

Los resultados confirman el uso de vacunas en el país con el perfil de la cepa F a través del hallazgo de este patrón en las aves, sin embargo en algunas zonas del país se utilizan autovacunas de MG y otras cepas vacunales como la TS-11, para lo cual la estandarización de diagnóstico y diferenciación por RFLP presentadas en el presente estudio podrían resultar de gran importancia para conocer y caracterizar las cepas que se están utilizando con este propósito. La caracterización de las diferentes cepas de uso vacunal (El Gazzar et al., 2011; Evans & Leigh, 2008) es de gran importancia para establecer las diferencias entre éstas y las cepas locales que se encuentran circulando actualmente en las granjas del país.

En relación con el hallazgo de muestras con el perfil RFLP de la cepa de campo o cepa R, deben hacerse estudios de secuenciación y qPCR (Sprygin et al., 2010; Kahya et al., 2010; Tayfun & Eyigor, 2003) que puedan determinar las características de estas cepas locales para poder conocer más acerca de la patogenicidad y persistencia de las mismas en las diferentes explotaciones (Collier et al., 2006).

### **3.7 Recomendaciones**

Se recomienda hacer estudios donde se relacionen los patrones RFLP con los parámetros zootécnicos de producción de los lotes de GPC y GRP, con el fin de determinar cuál es el efecto que tiene el MG en ellos, tanto el vacunal como el de campo.

También es importante, involucrar explotaciones de otras zonas del país para poder tener un mejor conocimiento del tipo de cepas que están afectando los lotes de aves comerciales.

En relación a las GRP y granjas de pollo de engorde, es importante hacer estudios en conjunto para poder determinar si la presencia de MG y MS que se observa en los lotes de pollo, corresponde a infecciones adquiridas o transmitidas verticalmente por gallinas infectadas a su progenie.

Igualmente se recomienda realizar estudios de secuenciación molecular de las cepas de campo y más estudios de diagnóstico por PCR y estudios diferenciales a través de la PCR-RFLP en otras zonas del país para tener un mejor conocimiento de las cepas que afectan la industria avícola nacional.

## Bibliografía

ABD-EL-MOTELIB, T.; KLEVEN, S. A comparative study of *Mycoplasma gallisepticum* vaccines in young chickens. Avian Dis 37, 981-987. 1993.

ASNANI, P.; AGARWAL, S. Serotyping of Avian Mycoplasma Species in India. Applied Microbiology 27 (6), 997-1000. 1974.

BRANTON, S.; LEIGH, S.; PURSWELL, J.; EVANS, J.; COLLIER, S.; OLAREWAJU, H. A Chronicle of serologic response in commercial layer chickens to vaccination with commercial F strain *Mycoplasma gallisepticum* vaccine. Avian Dis 54 (3), 1108-1111. 2010.

BRANTON, S.; LEIGH, S.; PURSWELL, J.; EVANS, J.; COLLIER, S.; OLAREWAJU, H. A Chronicle of serologic response in commercial layer chickens to vaccination with commercial F strain *Mycoplasma gallisepticum* vaccine. Avian Dis 54 (3), 1108-1111. 2010.

BRANTON, S.; LEIGH, S.; PURSWELL, J.; OLAREWAJU, H.; COLLIER, S. Effect of Selected Water Temperatures Used in *Mycoplasma gallisepticum* Vaccine Reconstitution on Titer at Selected Time Intervals. Avian Dis 52, 291-296. 2008.

BUIM, M.; METTIFOGO, E.; TIMENETSKY, J.; KLEVEN, S.; FERREIRA, A. Epidemiological survey on *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* by multiplex PCR in commercial poultry. Pesq.Vet.Bras. 29 (7), 552-556. 2009.

COLAS, M.; MERINO, A.; SANTANA, Y.; MIRANDA, Y.; BACALLAO, N.; LOBO, E. Serological study of agents associated to chronic respiratory syndrome in laying hens. Biotecnologia Aplicada 27, 232-236. 2010.

COLLIER, S.; PHARR, G.; BRANTON, S.; EVANS, J.; LEIGH, S.; FELFOLD, B. Initial Proteomics Analysis of Differentially Expressed Proteins from *Mycoplasma gallisepticum* Vaccine Strains ts-11 and F Detected by Western Blotting. Int.J.Poult.Sci 5 (4), 330-336. 2006.

EL GAZZAR, M.; LAIBINIS, V.; FERGUSON-NOEL, N. Characterization of a ts-11-like *Mycoplasma gallisepticum* Isolate from Commercial Broiler Chickens. *Avian Dis* 55 (4), 569-574. 2011.

EVANS, J.; LEIGH, S. Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* Vaccine Strains ts-11 and 685 from Commonly Used *Mycoplasma gallisepticum* Challenge Strains by PCR. *Avian Diseases* 52, 491-497. 2008.

FEBERWEE, A.; BANNISEHT-WYSMULLER, T.; VERNOOIJ, J.; GIELKENS, A.; STEGEMAN, J. The effect of vaccination with a bacterin on the horizontal transmission of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Pathol* 35 (1), 35-37. 2006.

HAGHIGHI-KHOSHKHOO, P.; MASOOD ROOHI, G.; INANLO, J.; MASOUMI, M.; SAMI-YOUSEFI, P. Seroprevalence of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* infection in the commercial layer flocks of the Centernorth of Iran. *Afr J Microbiol Res* 5 (18), 2834-2837. 2011.

HOSSAIN, K.; ALI, M.; HAQUE, M. Seroprevalence of *Mycoplasma gallisepticum* in chicken in the greater Rajshahi district of Bangladesh. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine* 5[1-2], 9-14. 2007.

KAHYA, S.; TEMELLI, S.; EYIGOR, A.; TAYFUN, K. Real-time PCR culture and serology for the diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* in chicken breeder flocks. *Veterinary Microbiology* 144 (3-4), 319-324. 2010.

KISS, I.; MATIZ, K.; KASZANYITZKY, E.; CHAVEZ, Y.; JOHANSSON, K. Detection and identification of avian mycoplasmas by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism assay. *Vet. Microbiol.* 58, 23-30. 1997.

KLEVEN, S. Mycoplasmas in the Etiology of Multifactorial Respiratory Disease. *Poult.Sci.* 77, 1146-1149. 1998.

KLEVEN, S.; FULTON, R.; GARCIA, M.; IKUTA, N.; LEITING, V.; LIU, T. Molecular Characterization of *Mycoplasma gallisepticum* Isolates from Turkeys. *Avian Dis* 48 (3), 562-569. 2004.

LIU, T.; GARCIA, M.; LEVISOHN, S.; YOGEV, D.; KLEVEN, S. Molecular Variability of the Adhesin-Encoding Gene *pvpA* among *Mycoplasma gallisepticum* Strains and Its Application in Diagnosis. *J Clin Microbiol* 39 (5), 1882-1888. 2001.

NIEVES, M.; ICOCHEA, E.; GONZALES, R.; FALCÓN, N. Seroprevalencia de *Mycoplasma synoviae* en pavos reproductores criados en la zona de Lima, Peru. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 2, 232-234. 2010.

SAMBROOK & RUSSEL. Appendix 9: Detection Systems. In: Sambrook & Russel, editor. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Third edition ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2101-2102. 2001.

SANCHEZ, B.; REDONDO, H.; RODRIGUEZ, M. Diferenciación de cepas vacunales de *Mycoplasma gallisepticum* 6/85 (Like-6/85), en muestras de campo mediante AP-PCR sobre genes *PMGA*, RFLP-PCR y secuenciación sobre genes *Lp* y *mgc2*. XLII Symposium Científico de Avicultura, 2005.

SPRYGIN, A.; ANDREYCHUK, D.; KOLOTILOV, A.; VOLKOV, M.; RUNINA, I.; MUDRAK, N. Development of a duplex real-time TaqMan PCR assay with an internal control for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in clinical samples from commercial and backyard poultry. *Avian Pathology* 39 (2), 99-109. 2010.

TAYFUN, K.; EYIGOR, A. Real-Time Polymerase Chain Reaction for Detection of *Mycoplasma gallisepticum* in Chicken Trachea. *Avian Diseases* 47, 712-717. 2003.

WHITHEAR, K.; HARRIGAN, K.; KLEVEN S. Standardized Method of Aerosol Challenge for Testing the Efficacy of *Mycoplasma gallisepticum* vaccine. *Avian Dis* 40, 654-660. 1996.



## **4. Análisis molecular de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* provenientes de granjas de reproductoras y ponedoras comerciales de la zona centro de Colombia**

### **4.1 Resumen**

En el presente estudio se secuenciaron productos de PCR positivos de los genes *mgc2* de MG y *vlhA* de MS, provenientes de muestras de campo de granjas de ponedoras comerciales (GPC) y reproductoras pesadas (GRP). Un total de 34 de muestras positivas a MG y 46 positivas a MS fueron secuenciadas y posteriormente analizadas sus relaciones filogenéticas. De los productos de PCR positivos de MG fueron seleccionadas muestras que presentaron previamente por RFLP los patrones de cepa F y de campo. En relación a las muestras positivas de MS, que seleccionaron muestras que presentaron una sola banda y otras donde se observaron dos amplicones. Tanto para las muestras que presentaron el perfil RFLP de cepa vacunal, como para las que presentaron el perfil RFLP de cepa de campo los porcentajes de identidad estuvieron entre el 96% y 100% entre ellas y del 98 % con la cepa vacunal y cepa R de referencia respectivamente.

En cuanto a las secuencias de los productos de PCR de MS que presentaron un único amplicon del gen *vlhA* de MS, se encontraron porcentajes de identidad entre ellas entre el 86 % y 97 % y con diferentes cepas de referencia tomadas del Genbank similaridades entre el 40 % y 97 %, mientras que los porcentajes de identidad de las muestras que presentaron dos amplicones se encontraron porcentajes de identidad entre ellas entre el 40 y el 95%, confirmando así la presencia de más de una cepa de MS, es decir infecciones mixtas por dos cepas de MS en una misma muestra de campo.

## 4.2 Abstract

In this study, PCR positive products for *mgc2* and *vlhA* genes from layer (GPC) and breeder (GRP) farms was sequencing. A total of 34 MG and 46 MS positives samples were analyzed for phylogenetic relationships. MG samples that showed vaccine F strain and field pattern was selected. For MS samples were selected samples that showed one and two amplicons.

Sequencing results confirmed two PCR-RFLP patterns form the *mgc2* gene of MG analyzed in this study, vaccine F strain pattern and a field strain pattern. The percentages of sequence identity were above of 96 % between samples and the reference sequences of Genbank. In some cases the percentages of identity was 100 %.

A portion of the MS*vlhA* gene was determined by sequencing from flocks samples of GPC and GRP. Sequence identity was between 86 % and 97 % between samples and 40 % and 97 % between samples and reference sequences. From samples showing two amplicons, the percentages of identity between samples was between 40 % and 95 %. The results of this study demonstrated the presence of two different MS sequences in the same flock.

## 4.3 Introducción

El diagnóstico de la micoplasmosis aviar producida por *Mycoplasma gallisepticum* (MG) y *Mycoplasma synoviae* (MS), tradicionalmente se ha hecho a través de pruebas serológicas (Rhoades et al., 1965; Jordan & Kulasegaram, 1968; Fiorentin et al., 2003; Buim et al., 2009), con buenos resultados para la evaluación general de los lotes en aves comerciales. En la actualidad, el avance y desarrollo de técnicas moleculares como la PCR, la RFLP (Sanchez et al., 2005b), AFLP (Hong et al., 2005) y la qPCR (Jarquin et al., 2009) actualmente brindan diagnósticos más rápidos, sensibles y específicos a las industrias avícolas a nivel mundial.

El manejo de las entidades infecciosas en avicultura, requiere de la aplicación de los más recientes desarrollos investigativos que permiten establecer características del genoma de los microorganismos con el fin de determinar si existen diferencias entre cepas de campo, así como la relación que éstas puedan tener con cepas vacunales utilizadas para

el manejo de la enfermedad (Harada et al., 2012; Jiang et al., 2009; Liu et al., 2001). En el caso particular de la micoplasmosis, la secuenciación del ADN y su análisis con herramientas bioinformáticas es de gran utilidad para alcanzar este propósito.

El presente trabajo se realizó para determinar las relaciones filogenéticas de cepas de campo de MG y MS entre ellas y con cepas reportadas en el Genbank. Las muestras provenían de granjas de ponedoras comerciales y de reproductoras pesadas. Es importante mencionar que en el caso del MG, éstas fueron previamente caracterizadas por PCR-RFLP y agrupadas de acuerdo con dos patrones, el patrón de cepa F y el correspondiente a cepa de campo (cepa R).

## **4.4 Materiales y Métodos**

A partir de muestras de campo provenientes de granjas de ponedoras comerciales (GPC) y reproductoras pesadas (GRP) a las cuales se les hizo PCR para diagnóstico de MG y MS y posterior RFLP a las muestras positivas de MG, se seleccionaron y secuenciaron un total de 80 muestras, 34 de MG y 46 de MS. Para la selección de las muestras a secuenciar se tuvo en cuenta la ubicación geográfica de las granjas de origen buscando de ésta manera cubrir la totalidad de la zona de muestreo del estudio. De las muestras de MG, 12 presentaron por RFLP el perfil 1 o perfil de cepa F y 22 el perfil 2 o perfil de cepa de campo. En relación a las muestras de MS, se purificaron 36 amplificados que presentaron una sola banda y se seleccionaron 10 muestras de aquellas que presentaron dobles bandas, obteniendo dos productos los cuales fueron secuenciados.

### **4.4.1 Protocolo de amplificación de *M. gallisepticum***

Se emplearon primers previamente reportados (García et al., 2005), que amplifican una región del gen *mgc2*, Tabla 4-1, el amplificado de esta porción del gen *mgc2* permite la diferenciación de algunas cepas directamente debido a que genera productos de tamaño diferente en cepas como la 6/85 y mediante pruebas post-PCR como la RFLP.

El volumen final de cada reacción de PCR fue de 50 µl, y se usaron los siguientes volúmenes y concentraciones: 5 µl de buffer para PCR 10 X (Invitrogen® Buffer PCR 10 X), 1.3 µl de MgCl 50 mM (Invitrogen® MgCl 50 mM), 1 µl de nucleótidos a 10 mM

(dATP, dCTP, dGTP, dTTP Invitrogen®), 0.4 µl de primer F (50 µM Invitrogen®) y 0.4 µl de primer R (50 µM Invitrogen®), Taq 0.2 µl de 5 U (Invitrogen® Platinum DNA Taq Polimerasa 5u/µl), 34.2 µl de agua, 2.5 µl de DMSO y 5 µl de ADN.

El perfil térmico empleado para MG fue: una denaturación inicial a 94 °C por 3 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 53 °C por 30 seg, 72 °C por 90 seg y una extensión final de 72 °C por 5 min.

#### 4.4.2 Protocolo de amplificación para *M. synoviae*

Se utilizaron primers previamente reportados (Wetzel et al., 2010), dirigidos al gen *vIhA*, amplificando una región de 300 - 390 pb. Ver Tabla 4-1.

El volumen final de cada reacción de PCR fue de 50 µl, con los siguientes volúmenes y concentraciones: 5 µl de buffer para PCR 10 X (Invitrogen® Buffer PCR 10 X), 2 µl de MgCl 50 mM (Invitrogen® MgCl 50 mM), 1 µl de nucleótidos a 10 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP Invitrogen®), 0.5 µl de primer F (50 µM Invitrogen®) y 0.5 µl de primer R (50 µM Invitrogen®), Taq 0.2 µl de 5 U (Invitrogen® Platinum DNA Taq Polimerasa 5u/µl), 32.8 µl de agua y 5 µl de ADN.

Para MS se empleó el siguiente perfil térmico: denaturación inicial a 94 °C por 3 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 57 °C por 30 seg, 72 °C por 90 seg y una extensión final de 72 °C por 5 min.

Para ambos casos se empleó un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient®

**Tabla 4-1:** Primers utilizados en las PCR de MG y MS

Primers	Secuencia	Producto	Referencia
MG-F	5' CGCAATTTGGTCCTAATCCCCAACA 3'	237 - 300 pb	García <i>et al.</i> , 2005
MG-R	5' TAAACCCACCTCCAGCTTTATTTCC 3'		
MS-F 1	5' CCATTGCTCCTGCTGTTAT 3'	300 pb	Wetzel <i>et al.</i> , 2010
MS-R 1	5' GATTCTGTTGTAGTTGCTTCAA 3'		

#### **4.4.3 Lectura de la prueba**

Los productos amplificados del PCR fueron determinados por electroforesis en gel de agarosa ultrapura (Invitrogen®) al 1.5% en buffer TAE 1 X, en un equipo PowerPac HC® (Bio-Rad Laboratories®) a 85 V por 95 min. Se usaron 5 µl de producto de PCR y 1 µl de EZ-Vision® (Amresco Life Science Research®) como buffer de carga y colorante. Como marcador de peso molecular (MP) se empleó el DNA GeneRuler 100 pb Plus® (Fermentas®). La lectura se hizo en un fotodocumentador GelDoc-XR® (Bio-Rad Laboratories®) bajo luz ultravioleta. Para el análisis de los geles se usó el software Quantity One Analysis 1-D 4.6.3 ® (Bio-Rad Laboratories®)

#### **4.4.4 Purificación de productos de PCR**

Para cada una de las muestras se evaluó la calidad y concentración de ADN puro, del producto de la PCR y del producto de la PCR purificado mediante espectrofotometría usando el Nanodrop 2000® (Thermo Scientific®).

El proceso de purificación de ADN fue hecho con el kit Purelink® PCR Purification Kit (Invitrogen®) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se agregaron 4 volúmenes del buffer de ligado que contenía isopropanol y se pasó a la columna de purificación. Se centrifugó a 14.000 rpm por 1 min, y luego se adicionó el buffer de lavado que contenía etanol y se centrifugó a 14.000 rpm por 3 min. Luego se adicionaron 25 µl del buffer de elución y se incubó por 1 min. Posteriormente se centrifugó a 14.000 rpm por dos min. El producto purificado se utilizó inmediatamente para la secuenciación.

#### **4.4.5 Purificación de productos de PCR a partir de gel de agarosa**

Se seleccionaron algunas de las muestras de MS que presentaron dos bandas, y se montaron por duplicado en geles de agarosa para poder hacer el corte y purificación de cada una de las bandas por separado. La purificación de estos productos fue hecha con el kit Purelink® Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen®) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se cortaron y pesaron las bandas del gel de agarosa y se colocaron en un tubo de microcentrífuga al cual se agregaron 3 volúmenes del buffer de solubilización por cada volumen de gel, y se llevaron los tubos a baño maría a 50 °C durante 10 min, pasando por el vortex cada 3 min y se dejó en incubación por 5 min más, luego se

agregó un volumen de isopropanol equivalente al peso de gel y se pasó el contenido a la columna de purificación. Se centrifugó a 14.000 rpm por 1 min, y luego se adicionó el buffer de lavado que contenía etanol y se centrifugó a 14.000 rpm por 3 min. Luego se adicionaron 25 µl del buffer de elución y se incubó por 1 min para luego centrifugar a 14.000 rpm por 2 min. El producto purificado se utilizó inmediatamente para la secuenciación.

Las muestras se secuenciaron bidireccionalmente con los primers F y R en MacroGen (MacroGen USA®).

Los cromatogramas fueron analizados con el software Seqman® (DNASTAR, Lasergene v.10®) Las secuencias consenso fueron obtenidas y analizadas con el software Seqman® (DNASTAR, Lasergene v.10®) Los análisis filogenéticos y de evolución molecular fueron hechos usando el software MEGA versión 5.1 (Tamura, Peterson, Stecher, Nei, and Kumar 2011).

## 4.5 Resultados

Para el análisis de las secuencias obtenidas se utilizaron las secuencias de referencia de las cepas reportadas en el Genbank. Para el caso de MG se seleccionaron las referencias de la cepa F, cepa 6/85, cepa Eis7C10 y para MS se hizo una selección de cepas de acuerdo a los resultados del BLAST individual que se realizó con cada una de las muestras.

### 4.5.1 *Mycoplasma gallisepticum*

Del total de 34 muestras previamente analizadas por PCR-RFLP y que presentaron dos patrones de corte definidos, se encontró que las secuencias de las 12 muestras que presentaron el patrón 1 o patrón de cepa F, tuvieron secuencias con porcentajes de identidad entre el 96 % y el 100 % entre ellas y porcentajes de identidad con la Cepa F de referencia<sup>12</sup> entre el 95, 7 % y 98, 7 % y con la cepa Eis7C10<sup>13</sup> entre el 97 % y 100 %. En relación a la secuencia de la vacuna Cepa F usada como control en el presente estudio, se encontró un 98 % de identidad con la cepa F de referencia y un 100 % con la

---

<sup>12</sup> Acceso Genbank AY556230.1

<sup>13</sup> Acceso Genbank HQ591358.1

cepa Eis7C10. Los resultados de los porcentajes de identidad para cada una de las secuencias analizadas y las cepas de referencia se muestran en la **Tabla 4-2**

Por otra parte, las muestras que presentaron el patrón 2 o patrón de cepa R, mostraron porcentajes de identidad entre ellas entre el 96 % y el 100 %, excepto una muestra en la que no fue mayor al 88,7 %. En cuanto a los porcentajes de identidad con cepa R de referencia<sup>14</sup>, estos fueron entre el 96 y 98 %, y la muestra que presentó el más bajo porcentaje con las demás, presentó un 85,3 % de identidad con la cepa R. Los resultados de los porcentajes de identidad para cada una de las secuencias analizadas y las cepas de referencia se muestran en la **Tabla 4-3**

**Tabla 4-2:** Porcentaje de identidad de muestras de campo con el patrón RFLP Cepa F

		Percent Identity																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
Divergence	1	■	98.7	53.3	98.0	81.5	98.0	95.7	98.4	98.7	98.0	98.0	98.4	97.7	98.4	98.0	98.7	1	AY556230.1 Strain F.seq
	2	1.3	■	74.9	100.0	82.0	99.7	97.0	100.0	100.0	99.7	99.7	100.0	99.3	100.0	99.7	100.0	2	HQ591358.1 Eis7-C-10.seq
	3	73.2	30.7	■	74.8	99.2	74.6	75.0	74.9	74.9	74.7	74.7	75.0	74.3	74.8	75.0	74.6	3	AY556231.1 Strain 685.seq
	4	2.0	0.0	30.9	■	82.0	99.7	97.0	100.0	100.0	99.7	99.7	100.0	99.3	100.0	99.7	100.0	4	CepaF.seq
	5	21.3	20.7	0.9	20.7	■	82.0	82.0	82.0	82.0	81.5	81.5	82.0	81.1	82.0	82.0	81.6	5	Vacuna 6-85.seq
	6	2.0	0.3	31.2	0.3	20.7	■	96.7	99.7	99.7	99.3	99.3	99.7	99.0	99.7	99.3	99.7	6	MG7.seq
	7	4.1	2.7	30.2	2.7	20.2	3.0	■	97.0	97.0	96.7	96.7	97.0	96.4	97.0	97.4	97.0	7	MG12.seq
	8	1.7	0.0	30.7	0.0	20.7	0.3	2.7	■	100.0	99.7	99.7	100.0	99.3	100.0	99.7	100.0	8	MG13.seq
	9	1.3	0.0	30.7	0.0	20.7	0.3	2.7	0.0	■	99.7	99.7	100.0	99.3	100.0	99.7	100.0	9	MG20.seq
	10	1.7	0.0	30.7	0.0	20.8	0.3	2.7	0.0	0.0	■	99.3	99.7	99.0	99.7	99.3	99.7	10	MG27.seq
	11	2.0	0.3	31.1	0.3	21.2	0.7	3.0	0.3	0.3	0.3	■	99.7	99.3	99.7	99.3	99.7	11	MG61.seq
	12	1.7	0.0	30.6	0.0	20.7	0.3	2.7	0.0	0.0	0.0	0.3	■	99.3	100.0	99.7	100.0	12	MG69.seq
	13	2.3	0.7	31.5	0.7	21.8	1.0	3.4	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	■	99.3	99.0	99.3	13	MG86.seq
	14	1.7	0.0	30.9	0.0	20.7	0.3	2.7	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.7	■	99.7	100.0	14	MG126.seq
	15	1.7	0.0	30.2	0.0	20.2	0.3	2.7	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.7	0.0	■	99.7	15	MG172.seq
	16	1.3	0.0	31.2	0.0	21.1	0.3	2.7	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.7	0.0	0.0	■	16	MG189.seq
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16			

<sup>14</sup> Acceso Genbank AY556228.1

Tabla 4-3: Porcentajes de identidad de muestras de campo con el patrón RFLP cepa R

		Percent Identity																										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25		
Divergence	1	█	69.6	65.6	53.5	51.1	97.4	97.3	97.0	95.7	98.0	97.0	97.9	96.3	98.0	96.3	96.0	96.0	96.3	96.3	96.3	98.0	98.3	96.3	97.7	85.3	1	AY556228.1 strain R.seq
	2	39.0	█	94.0	54.4	49.9	98.0	98.0	97.7	96.7	99.0	98.3	99.0	97.3	99.0	97.3	97.0	97.0	97.3	97.3	97.3	99.0	99.3	96.7	98.0	86.6	2	AY556229.1 Strain S6.seq
	3	46.0	6.3	█	52.6	47.8	91.7	91.7	91.4	91.7	92.7	91.7	93.1	92.4	92.7	92.3	92.0	92.0	92.4	92.4	91.0	92.7	93.0	90.7	92.1	80.7	3	AY556230.1 Strain F.seq
	4	72.7	70.3	75.1	█	97.5	75.2	75.1	75.2	74.5	75.8	74.8	76.5	75.1	75.8	75.3	74.8	74.7	75.1	75.1	74.4	75.4	75.5	74.8	75.2	68.0	4	AY556231.1 Strain 685.seq
	5	79.3	82.7	89.5	2.6	█	75.5	75.4	75.5	73.5	75.5	74.4	76.1	74.1	75.5	74.3	73.8	73.7	74.1	74.1	74.8	75.1	75.2	75.2	75.6	62.7	5	GQ436785.1 Clone 928.seq
	6	2.7	2.0	8.8	30.2	29.7	█	100.0	99.7	96.4	98.0	98.3	98.3	96.3	98.0	96.3	96.0	96.0	96.3	96.3	97.0	97.7	98.3	98.0	99.3	87.7	6	MG22.seq
	7	2.7	2.0	8.9	30.3	29.8	0.0	█	99.7	96.3	98.0	98.3	98.3	96.3	98.0	96.3	96.0	96.0	96.3	96.3	97.0	97.7	98.3	98.0	99.3	87.7	7	MG29.seq
	8	3.0	2.4	9.2	30.2	29.7	0.3	0.3	█	96.0	97.7	98.0	98.3	96.0	97.7	96.3	95.7	95.7	96.0	96.0	97.3	97.3	98.0	98.3	99.0	87.4	8	MG46.seq
	9	4.4	3.4	8.8	31.2	32.7	3.7	3.8	4.1	█	97.0	96.7	97.2	99.7	97.0	99.7	99.3	99.3	99.7	99.7	97.4	96.7	97.4	96.4	96.3	86.8	9	MG54.seq
	10	2.0	1.0	7.7	29.2	29.7	2.0	2.0	2.4	3.0	█	99.0	99.7	97.7	100.0	97.7	97.3	97.3	97.7	97.7	97.7	99.7	99.7	97.0	98.7	88.4	10	MG70.seq
	11	3.1	1.7	8.9	30.8	31.4	1.7	1.7	2.0	3.4	1.0	█	99.3	96.7	99.0	96.7	96.3	96.3	96.7	96.7	97.3	98.7	98.7	96.3	97.7	88.7	11	MG72.seq
	12	2.1	1.0	7.3	28.3	28.8	1.8	1.8	1.8	2.8	0.3	0.7	█	97.2	99.7	97.2	96.9	96.9	97.2	97.2	98.3	99.3	99.3	97.2	98.3	88.6	12	MG75.seq
	13	3.7	2.7	8.1	30.3	31.8	3.8	3.8	4.1	0.3	2.4	3.4	2.8	█	97.7	100.0	99.7	99.7	100.0	100.0	97.0	97.3	98.0	96.3	97.0	86.7	13	MG85.seq
	14	2.0	1.0	7.7	29.2	29.7	2.0	2.0	2.4	3.0	0.0	1.0	0.3	2.4	█	97.7	97.3	97.3	97.7	97.7	97.7	99.7	99.7	97.0	98.7	88.4	14	MG89.seq
	15	3.8	2.7	8.1	29.9	31.4	3.8	3.8	3.8	0.3	2.4	3.4	2.8	0.0	2.4	█	99.7	99.7	100.0	100.0	97.3	97.3	98.0	96.7	97.0	86.7	15	MG94.seq
	16	3.8	2.7	8.1	30.4	32.0	3.8	3.8	4.1	0.3	2.4	3.4	2.8	0.0	2.4	0.0	█	99.3	99.7	99.7	96.7	97.0	97.7	96.0	96.7	86.4	16	MG139.seq
	17	4.1	3.1	8.5	30.9	32.5	4.1	4.1	4.5	0.7	2.7	3.8	3.2	0.3	2.7	0.3	0.3	█	99.7	99.7	96.7	97.0	97.7	96.0	96.7	86.3	17	MG142.seq
	18	3.7	2.7	8.1	30.3	31.8	3.8	3.8	4.1	0.3	2.4	3.4	2.8	0.0	2.4	0.0	0.0	0.3	█	100.0	97.0	97.3	98.0	96.3	97.0	86.7	18	MG143.seq
	19	3.7	2.7	8.1	30.3	31.8	3.8	3.8	4.1	0.3	2.4	3.4	2.8	0.0	2.4	0.0	0.0	0.3	0.0	█	97.0	97.3	98.0	96.3	97.0	86.7	19	MG149.seq
	20	3.7	2.7	9.6	31.3	30.8	3.1	3.1	2.7	2.7	2.4	2.7	1.8	3.1	2.4	2.7	3.1	3.4	3.1	3.1	█	97.3	98.0	98.3	97.0	87.7	20	MG156.seq
	21	2.0	1.0	7.7	29.8	30.3	2.4	2.4	2.7	3.4	0.3	1.4	0.7	2.7	0.3	2.7	2.7	3.1	2.7	2.7	2.7	█	99.3	96.7	98.3	88.0	21	MG165.seq
	22	1.7	0.7	7.3	29.7	30.2	1.7	1.7	2.0	2.7	0.3	1.3	0.7	2.0	0.3	2.0	2.0	2.4	2.0	2.0	2.0	0.7	█	97.3	99.0	88.1	22	MG186.seq
	23	3.4	3.1	9.6	30.3	29.8	1.7	1.7	1.3	3.4	2.7	3.4	2.5	3.4	2.7	3.1	3.4	3.8	3.4	3.4	1.3	3.1	2.4	█	98.3	86.7	23	MG190.seq
	24	2.3	2.0	8.4	30.1	29.6	0.7	0.7	1.0	3.8	1.3	2.4	1.8	3.1	1.3	3.1	3.1	3.4	3.1	3.1	3.1	1.7	1.0	1.3	█	86.5	24	MG194.seq
	25	16.0	14.4	22.1	41.6	51.5	13.0	13.1	13.4	14.2	12.3	11.9	12.0	14.3	12.3	14.4	14.4	14.8	14.3	14.3	13.1	12.7	12.6	13.9	14.6	█	25	MG201.seq
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25			

Se realizó un alineamiento con BLAST para la muestra que presentó el más bajo porcentaje de identidad con las muestras de campo y la secuencia referencia de la cepa R y se encontró que tenía homología del 100 % de identidad con un reporte<sup>15</sup> de un aislamiento hecho en Rusia en muestras de campo procedentes de granjas pollos y pavos que presentaron sintomatología respiratoria y en las cuales se realizó el aislamiento de MG.

La relación filogenética de las muestras con los patrones RFLP 1 y RFLP 2 se muestran en el Anexo B

#### 4.5.2 *Mycoplasma synoviae*

Se realizó BLAST a cada una de las secuencias de MS obtenidas en el presente estudio y se encontró una altísima variabilidad en los resultados y por tanto un gran número de cepas con las cuales se encontró el mayor porcentaje de homología. Igualmente, en el análisis de los alineamientos de las muestras se encontraron 6 clúster definidos (Anexo B) y para efectos de los análisis, se seleccionaron dos muestras de cada clúster y se

<sup>15</sup> Acceso Genbank FJ965788.1



analizaron con las siguientes secuencias reportadas en el Genbank: cepa WVU1853 (HQ326484.1); cepa 94011 (DQ661614.1); cepa B45/04 (FM164370.1); cepa NZMSID181 (AB507391.1) y cepa EEA (FJ495803.1), las cuales fueron seleccionadas por ser las cepas que mayor porcentaje de homología presentaron en los análisis de BLAST.

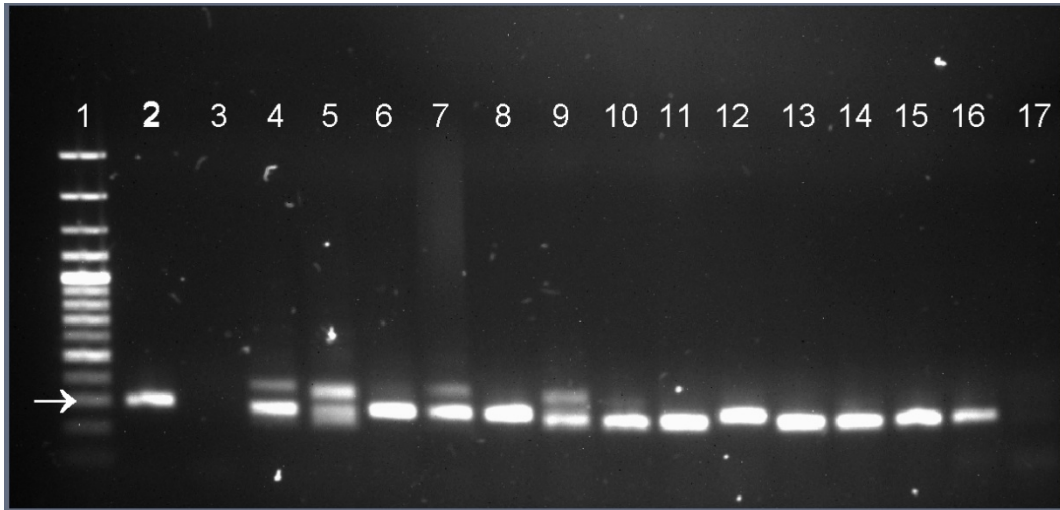
Los porcentajes de identidad entre las muestras fueron del 83.2 % al 96.9 % y en un solo caso fue del 100 %. En relación a los porcentajes con las diferentes cepas de referencia se encontró que las muestras solo tenían un porcentaje de identidad del 38.9 % al 43.8 % con la cepa WVU1853, del 88 % al 95 % con la cepa B45/04, del 82 % al 97.7 % con la cepa NZMSID181, del 89 % al 95.5 % con la cepa 94011 y del 81.7 % al 96.8 % con la cepa EEA. Los resultados de los porcentajes de identidad encontrado entre las muestras de campo y las cepas de referencia se muestran en la **Tabla 4-4**.

**Tabla 4-4:** Porcentajes de identidad de muestras de MS purificados de productos de PCR con cepas de referencia

		Percent Identity																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
Divergence	1	■	41.8	95.8	96.6	95.8	93.2	95.0	95.7	94.9	95.0	96.4	96.4	95.5	88.6	97.4	83.4	1	FM164370.1 Strain B45 04.seq
	2	121.2	■	41.8	43.1	43.8	40.5	41.3	38.9	38.6	42.5	40.9	39.3	41.8	40.9	41.4	43.7	2	HQ326484.1 WVU1853.seq
	3	4.3	118.3	■	97.7	96.5	92.8	94.1	93.5	93.8	97.2	96.8	92.9	95.5	89.5	97.1	82.0	3	AB507391.1 Strain NZMSID181.seq
	4	3.5	111.9	2.4	■	97.1	93.6	95.0	88.2	94.2	97.5	97.2	94.9	96.0	89.1	97.4	80.9	4	DQ661614.1 Strain 94011.seq
	5	4.3	107.9	3.6	3.0	■	94.3	95.4	95.0	95.3	95.4	96.8	93.9	95.5	88.8	96.7	81.7	5	FJ495803.1 Strain EEA.seq
	6	6.7	124.6	7.2	6.3	5.5	■	100.0	93.8	94.1	94.7	95.7	92.2	91.4	87.6	95.2	79.1	6	MS30.seq
	7	5.2	121.4	6.2	5.2	4.8	0.0	■	94.8	94.4	95.0	95.8	92.2	91.4	90.0	95.8	81.4	7	MS21.seq
	8	4.5	137.3	6.8	12.8	5.2	6.1	5.3	■	98.8	94.5	96.9	94.1	94.8	89.5	96.3	80.9	8	MS101.seq
	9	5.3	139.1	6.5	6.1	4.8	5.7	5.8	1.2	■	94.2	96.5	94.1	94.8	89.1	97.1	81.3	9	MS12.seq
	10	4.4	113.4	2.2	1.8	4.0	4.4	4.8	4.9	5.3	■	96.8	93.9	94.9	89.8	96.3	83.2	10	MS134.seq
	11	3.7	124.5	3.2	2.9	3.3	4.4	4.4	3.2	3.6	2.5	■	95.4	95.5	91.5	99.6	83.5	11	MS142.seq
	12	3.6	138.2	7.5	5.3	6.4	8.3	8.3	6.2	6.2	5.8	4.7	■	95.8	87.8	95.4	88.3	12	MS51.seq
	13	4.7	119.8	4.7	4.2	4.7	9.2	9.2	5.5	5.5	4.7	4.7	4.4	■	89.8	95.5	91.4	13	MS62.seq
	14	12.0	119.8	11.0	11.4	11.8	13.0	10.5	11.3	11.8	10.0	8.7	12.9	10.5	■	91.5	78.5	14	MS87.seq
	15	2.6	121.5	3.0	2.6	3.4	5.0	4.4	3.8	2.9	3.0	0.4	4.7	4.7	8.6	■	82.7	15	MS149.seq
	16	15.3	105.2	17.1	18.6	17.6	20.6	17.7	18.8	18.1	14.8	15.2	8.4	4.4	21.8	16.2	■	16	MS43.seq

Del mismo modo, las secuencias de las muestras que tuvieron doble banda en la PCR (Figura 4-1), presentaron porcentajes de identidad entre ellos entre el 40 % y hasta el 99.2 %, mientras que con las cepas de referencia los porcentajes de identidad encontrados fueron del 38 % al 43 % con la cepa WVU1853, del 45 % al 96.4 % con la cepa B45/04, del 42 % al 98.9 % con la cepa NZMSID181, del 46 % al 98.2 % con la cepa 94011 y del 44 al 96.8 % con la cepa EEA. Ver **Tabla 4-5**.

**Figura 4-1:**Amplificados de MS en Agarosa 1.5 % Líneas: **1.** Flecha MP de 300 pb ; **2.CP;** **3.CN;** **4.Doble banda (DB)** **5.DB;** **6. Banda única (BU);** **7.DB;****8.BU;** **9. DB;** **10. a 16. BU**



**Tabla 4-5:**Porcentaje de similaridad de cepas de MS purificados a partir de gel con cepas de referencia.

		Percent Identity																					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
Divergence	1	■	41.2	95.8	96.6	96.4	91.5	95.0	95.9	96.4	96.1	95.0	92.4	45.1	95.8	90.4	90.0	95.4	91.1	89.6	95.8	1	FM164370.1 Strain B45 04.seq
	2	117.3	■	41.7	42.2	42.6	41.2	40.0	40.3	40.1	40.1	42.6	40.5	43.4	40.9	38.3	38.8	41.8	38.9	40.3	41.3	2	HQ326484.1 WVU1853.seq
	3	4.3	114.8	■	97.7	97.1	90.7	94.0	96.7	94.6	94.3	97.9	94.3	42.6	95.9	90.8	90.8	96.1	91.9	88.3	98.9	3	AB507391.1 Strain NZMSID181.seq
	4	3.5	111.6	2.4	■	97.7	91.5	94.3	96.7	96.1	95.8	98.2	95.3	46.2	96.3	90.5	90.8	97.2	92.9	89.0	96.9	4	DQ661614.1 Strain 94011.seq
	5	3.7	109.5	3.0	2.4	■	91.9	96.1	96.3	96.5	96.1	96.5	92.4	43.6	96.3	90.5	90.1	96.8	92.6	90.8	96.1	5	FJ495803.1 Strain EAA.seq
	6	8.6	116.9	9.6	8.6	8.2	■	92.2	89.7	91.0	90.7	91.2	91.0	43.3	91.3	84.4	83.8	91.1	87.5	91.4	92.9	6	MS194-1.seq
	7	5.2	122.4	6.3	5.9	4.0	7.8	■	95.4	95.3	95.4	94.3	90.4	45.5	94.9	89.6	88.6	94.6	91.8	89.2	94.2	7	MS28.seq
	8	3.4	121.3	2.5	2.5	2.9	9.8	3.9	■	95.9	95.9	96.3	93.0	45.7	95.0	91.8	91.8	96.3	92.2	95.5	97.3	8	MS28-1.seq
	9	3.6	122.9	5.6	4.0	3.6	9.2	4.8	3.4	■	100.0	95.4	91.0	43.8	96.3	89.7	89.4	96.4	92.2	96.5	93.4	9	MS37.seq
	10	4.0	122.9	5.9	4.4	4.0	9.6	4.8	3.4	0.0	■	95.4	91.0	43.8	96.3	89.7	89.4	96.5	92.2	96.5	93.4	10	MS37-1.seq
	11	5.1	110.1	2.2	1.8	3.6	9.0	6.0	3.0	4.8	4.7	■	95.3	46.2	95.0	90.7	90.8	96.8	92.6	95.3	97.3	11	MS52.seq
	12	5.0	115.1	3.0	2.0	5.1	6.6	7.3	3.7	6.6	6.6	2.0	■	42.6	91.9	85.7	89.0	92.9	87.7	91.3	93.8	12	MS52-1.seq
	13	104.3	110.5	117.2	100.3	110.6	113.3	103.2	103.1	112.2	112.2	99.8	109.2	■	43.5	43.3	41.7	45.1	42.5	46.2	42.5	13	MS60.seq
	14	4.3	119.7	4.3	3.9	3.9	9.3	5.3	4.1	3.8	3.8	5.2	5.6	115.0	■	88.8	91.7	96.2	91.7	95.8	94.7	14	MS60-1.seq
	15	3.9	117.6	3.5	3.8	3.9	10.2	5.1	2.7	4.7	4.7	3.5	4.4	101.5	4.6	■	87.2	90.0	86.5	91.0	91.1	15	MS76.seq
	16	5.8	118.3	5.0	5.0	5.8	12.7	7.8	4.0	6.6	6.6	5.0	3.7	112.8	3.6	4.4	■	90.7	88.3	89.1	90.3	16	MS76-1.seq
	17	4.8	113.7	4.0	2.9	3.3	9.5	5.6	3.0	3.7	3.6	3.3	4.6	105.5	3.9	4.3	5.0	■	95.0	95.7	95.3	17	MS104.seq
	18	4.2	116.5	3.4	2.3	2.7	8.2	4.3	2.7	3.1	3.0	2.7	4.3	107.4	2.7	3.7	4.8	0.0	■	92.6	90.7	18	MS104-1.seq
	19	10.8	121.9	12.4	11.5	9.5	8.7	0.8	3.9	3.6	3.6	4.9	7.0	102.8	4.4	4.3	6.8	4.5	3.4	■	94.4	19	MS190-1.seq
	20	3.6	114.8	0.4	2.4	3.2	6.7	5.3	0.9	6.1	6.1	2.0	2.5	116.4	4.6	1.7	4.2	4.0	3.4	5.0	■	20	MS194.seq

### 4.6 Discusión

Los resultados de la secuenciación de productos de los dos patrones RFLP encontrados en los productos del gen *mgc2* de MG, confirman la utilidad diagnóstica de la PCR-RFLP utilizando la enzima *HaeIII* para su uso en muestras de campo y la posibilidad que brinda

de diferenciar muestras de origen vacunal de muestras de origen de campo, como lo es la cepa R.

Solo una muestra presentó un bajo porcentaje de identidad con la cepa de referencia de campo y con las demás muestras del estudio. Este hallazgo puede deberse a la presencia en el campo de cepas de MG con características diferentes a las cepas analizadas, por lo cual se deben hacer trabajos de investigación que incluyan como complemento de los estudios moleculares, el intento de aislamiento para de esta forma poder caracterizar este tipo de cepas con estudios de patogenicidad(Gharaibeh & Al Roussan, 2008).

Los resultados de MS del presente trabajo se pueden asociar directamente a la presencia de cepas de campo en las granjas, debido a que en el país no está reportado el uso de vacunas vivas de MS. En Colombia la única vacuna contra MS que se encuentra aprobada y cuyo uso aun es limitado, es una bacterina que contiene la cepa WVU1853, la cual, según los análisis de las secuencias de campo, es la cepa con los más bajos porcentajes de identidad encontrados.

La secuenciación de algunos de los productos que presentaron dobles bandas confirmó que se trata de infecciones dobles por MS, es decir que las aves están infectadas por más de una cepa de MS, lo cual coincide con los reportado por (Wetzel et al., 2010) en relación a la presencia de dos cepas diferentes de MS en un mismo pool de muestras de campo. El análisis del porcentaje de identidad de este grupo de muestras no fue alto, lo que coincide con los resultados del BLAST, donde se observó que las muestras de un mismo lote tenían porcentajes de homologías totalmente diferentes entre sí y con las cepas reportadas en el Genbank.

La alta variabilidad y bajos porcentajes de identidad entre las secuencias de MS coinciden con los reportado previamente, en relación a la alta capacidad de cambio que presenta la zona hipervariable del gen *v1hA*(Jeffery et al., 2006), con una alta posibilidad de recombinaciones y por tanto la consecuente evasión del sistema inmune del huésped (May & Brown, 2011).

El uso de vacunas en avicultura requiere del conocimiento de las cepas que están circulando en el campo y del origen de las infecciones, para de esta manera definir el tipo

de biológicos que deberían usarse para tener un control efectivo de la enfermedad (Nicholas et al., 2009).. A este respecto, el trabajo de investigación que involucre el intento de aislamientos de las bacterias que se encuentran circulando en las granjas, daría la posibilidad de realizar estudios que puedan llevar al desarrollo de biológicos basados en las cepas que presentan características propias de nuestro medio.

## **4.7 Recomendaciones**

Los resultados encontrados sugieren la necesidad de iniciar trabajos con aislamientos de micoplasmas como una herramienta de investigación, intentando en primera instancia el aislamiento de las cepas de MG y MS que se encuentran en el campo y a partir de estos cultivos obtener mayor información acerca del comportamiento y características de las bacterias que están circulando en las granjas.

De igual manera se recomienda ampliar la cobertura de este tipo de estudios a otras zonas avícolas del país e incluir las granjas de pollo de engorde en los mismos.

## Bibliografía

BUIM, M.; METTIFOGO, E.; TIMENETSKY, J.; KLEVEN, S.; FERREIRA, A. Epidemiological survey on *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* by multiplex PCR in commercial poultry. *Pesq.Vet.Bras.* 29 (7), 552-556. 2009.

FIORENTIN, L.; MORES, M.; TREVISOL, I.; ANTUNES, S.; COSTA, J.; SONCINI, R. Test Profiles of Broiler Breeder Flocks Housed in Farms with Endemic *Mycoplasma synoviae* Infection. *Braz J Poult Sci* 5 (1), 37-43. 2003.

GARCÍA, M.; IKUTA, N.; LEVISOHN, S.; KLEVEN, S. Evaluation and Comparison of Various PCR Methods for Detection of *Mycoplasma gallisepticum* Infection in Chickens. *Avian Dis* 49 (1), 125-132. 2005.

GHARAIBEH, S.; AL ROUSSAN, D. The use of Molecular techniques in isolation and characterization of *Mycoplasma gallisepticum* from commercial chickens in Jordan. *Int.J.Poult.Sci.* 7 (1), 28-35. 2008.

HAMMOND, P.; RAMIRES, A.; MORROW, C.; BRADBURY, J. Development and evaluation of an improved diagnostic PCR for *Mycoplasma synoviae* using primers located in the haemagglutinin encoding gene *vlhA* and its value for strain typing. *Vet. Microbiol.* 136, 61-68. 2009.

HARADA, K.; KIJIMA-TANAKA, M.; UCHIYAMA, M.; YAMAMOTO, R.; OISHI, K.; ARAO, M. Molecular typing of Japanese field isolates and live commercial vaccine strain of *Mycoplasma synoviae* using improved pulsed-field gel electrophoresis and *vlhA* gene sequencing. *Avian Dis* 53 (4), 538-543. 2012.

HONG, Y.; GARCIA, M.; LEVISOHN, S.; LYSNYANSKY, I.; LEITING, V.; SVELKOU, P. Evaluation of Amplified Fragment Length Polymorphism for Differentiation of Avian *Mycoplasma* Species. *J Clin Microbiol* 43 (2), 909-912. 2005.

JARQUIN, R.; SCHULTZ, J.; HANNING, I.; RICKE, SC. Development of a Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for the Simultaneous Detection of *Mycoplasma*

*gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* Under Industry Conditions. Avian Diseases 53, 73-77. 2009.

JEFFERY, N.; BROWNING, G.; NOORMOHAMMADI, AH. Organization of the *Mycoplasma synoviae* WVU 1853<sup>T</sup> *vlhA* gene locus. Avian Pathol 35 (1), 53-57. 2006.

JIANG, H.; CHEN, J.; YAN, H.; LI, X.; CHEN, Z.; ZENG, Z. Molecular Variability of DR-1 and DR-2 Within the *pvpA* Gene in *Mycoplasma gallisepticum* Isolates. Avian Dis 53, 124-128. 2009.

JORDAN, F.; KULASEGARAM, P. Serological Tests for the Detection of Antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* in Chickens and Turkeys. Journal of Hygiene 66, 249-267. 1968.

LIU, T.; GARCIA, M.; LEVISOHN, S.; YOGEV, D.; KLEVEN, S. Molecular Variability of the Adhesin-Encoding Gene *pvpA* among *Mycoplasma gallisepticum* Strains and Its Application in Diagnosis. J Clin Microbiol 39 (5), 1882-1888. 2001.

MAY, M.; BROWN, D. Diversity of expressed *vlhA* adhesin sequences and intermediate hemagglutination phenotypes in *Mycoplasma synoviae*. J Bacteriol 193 (9), 2116-2121. 2011.

NICHOLAS, R.; AYLING, R.; MCAULIFFE, L. Vaccines for Mycoplasma diseases in animals and man. J.Comp.Path 140, 85-96. 2009.

SANCHEZ, B.; REDONDO, H.; BRANDY, L.; MARTÍNEZ, A.; RODRIGUEZ, M Diferenciación de cepas vacunales de *Mycoplasma gallisepticum* 6/85 (Like-6/85), en muestras de campo mediante AP-PCR sobre genes PMGA, RFLP-PCR y secuenciación sobre genes *Lp* y *mgc2*. XLII Symposium Científico de Avicultura.2005.

WETZEL, A.; LEFEVRE, KM.; RAVIV, Z. Revised *Mycoplasma synoviae vlhA* PCRs. Avian Dis 54 (4), 1292-1297. 2010.

## 5. Conclusiones y recomendaciones

### 5.1 Conclusiones

El presente trabajo estableció la presencia de *Mycoplasma gallisepticum* (MG) y *Mycoplasma synoviae* (MS) a partir de hisopos traqueales provenientes de granjas de ponedoras comerciales y reproductoras pesadas de la zona centro del país mediante el uso de la técnica de PCR y dejó normalizada la técnica como una herramienta de diagnóstico a partir de muestras de campo para la industria avícola nacional. Los altos porcentajes de positividad encontrados en los dos diferentes tipos de explotación sugieren la gran actividad que tiene la micoplasmosis en las granjas del centro del país. En cuanto a la presencia de MS, debido a que actualmente no se usan vacunas vivas, los resultados sugieren la presencia de cepas de campo circulando en las granjas, por lo cual es importante hacer estudios que puedan establecer el real impacto que tiene esta enfermedad en los resultados zootécnicos de las diversas explotaciones y su implicación económica.

Igualmente se diferenciaron productos de PCR de MG con la técnica de PCR-RFLP en dos patrones, uno que corresponde al patrón de vacuna viva cepa F y otro que corresponde al patrón de cepa de campo o cepa R. Los resultados de los patrones encontrados en las muestras de campo después de la digestión enzimática fueron consistentes y permiten a los avicultores determinar qué tipo de cepa está presente en sus explotaciones. De igual manera, la normalización de esta técnica va a permitir hacer seguimientos a los programas vacunales que involucren la Cepa F en las granjas avícolas, logrando determinar si la cepa está presente en las aves después de su uso y si se establecen monitoreos

programados poder determinar la persistencia de la misma en las granjas y/o el surgimiento de cepas de campo que puedan infectar las aves.

Se determinaron las secuencias de 80 muestras de campo de MG y MS y se analizó la relación filogenética entre ellas y con secuencias de referencia reportadas en el Genbank. El análisis de las secuencias de MG, mostró un alto porcentaje de identidad entre las diferentes muestras en estudio así como con las cepas de referencia, con muy pocos cambios a nivel filogenético. En relación a MS, se encontró una altísima variabilidad y diferencias entre las muestras y con las cepas de referencia. El alto porcentaje de positividad encontrado en las granjas debe ser considerado como el punto de partida para nuevos estudios donde no solo se evalué la presencia del agente, sino que se pueda determinar la dinámica del agente en cada una de las explotaciones y su relación con los problemas respiratorios y/o articulares con los que normalmente lo asocia la literatura científica a nivel mundial.

## 5.2 Recomendaciones

Se recomienda hacer estudios de similares características en granjas de pollo de engorde para poder evaluar la presencia y comportamiento de MG y MS en este tipo de explotaciones y asociarlos con las granjas de reproductoras lo cual es de importancia para caracterizar el origen de las infecciones a nivel de campo y la relevancia que podrían tener las infecciones verticales hacia la progenie.

La presencia de infecciones mixtas por los dos agentes, requiere del establecimiento de medidas de control que puedan minimizar al máximo el impacto de la enfermedad en las aves, por lo cual se debe conocer la dinámica de cada una de las infecciones, para de esta manera plantear las mejores medidas de control.

Es importante realizar análisis serológicos junto a las pruebas moleculares y buscar asociaciones entre estos y los aspectos zootécnicos y clínicos de los lotes en estudio,



con el fin de establecer correlaciones entre la presencia de cepas de campo, cepas de origen vacunal, la seroconversión y la protección de las aves.

Debido al poco conocimiento local que en general se tiene sobre impacto económico de la micoplasmosis producida por MG y MS en las granjas del país, es importante establecer el mapa de la enfermedad para las diferentes aéreas o zonas avícolas. Las futuras investigaciones deben involucrar el intento de aislamientos de las cepas que actúan en el campo para conocer más acerca de la patogenicidad de las mismas y estudiar su potencial como posible material para la investigación y elaboración de autovacunas.



## A. Anexo: Preparación de reactivos

Anexo 1: Preparación de PBS para el lavado de hisopos traqueales

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
Agua Bidestilada	1 litro
Ajustar pH a 7,2	

Anexo 2: **Preparación de EDTA 0,5 M pH 8**

Disodium EDTA 2 H <sub>2</sub> O	186,1 g
Agua	800 ml
Ajuste de pH a 8 usando hojuelas de NaOH	

Anexo 3: **Preparación de Buffer TAE 50 X**

Tris Ultrapuro (Invitrogen®)	242 g	1,9 M
Acido Acético Glacial	571 ml	57,1%
EDTA 0,5 M pH 8		100 ml 0,05 M
Completar con agua bidestilada hasta 1000 ml		

Anexo 4: **Preparación de Buffer TBE 5 X**

Tris Ultrapuro (Invitrogen®)	54 g	0,45 M
Ácido Bórico	27,5 g	0,45 M
EDTA 0,5 M pH 8	20 ml	0,01 M
Agua Bidestilada	980 ml	

**Anexo 5:** Preparación de Poliacrilamida Stock 30 %

Acrilamida (Bio-Rad Laboratories®)	29 g
Bis acrilamida (Bio-Rad Laboratories®)	1 g
Completar con agua Bidestilada hasta	80 ml
Rhinohide™ Polyacrylamide Gel	
Strengthen Concentrate (Invitrogen®)	20 ml

Anexo 6: Solución de Fijación y/o detención

Etanol 96 %	50 ml
Ácido Acético Glacial	2 ml
Completar con agua bidestilada a	500 ml

Anexo 7: **Solución de tinción de plata**

Nitrato de plata (Sigma®)	1,6 g
Agua bidestilada	500 ml

Anexo 8: **Solución de Revelado**

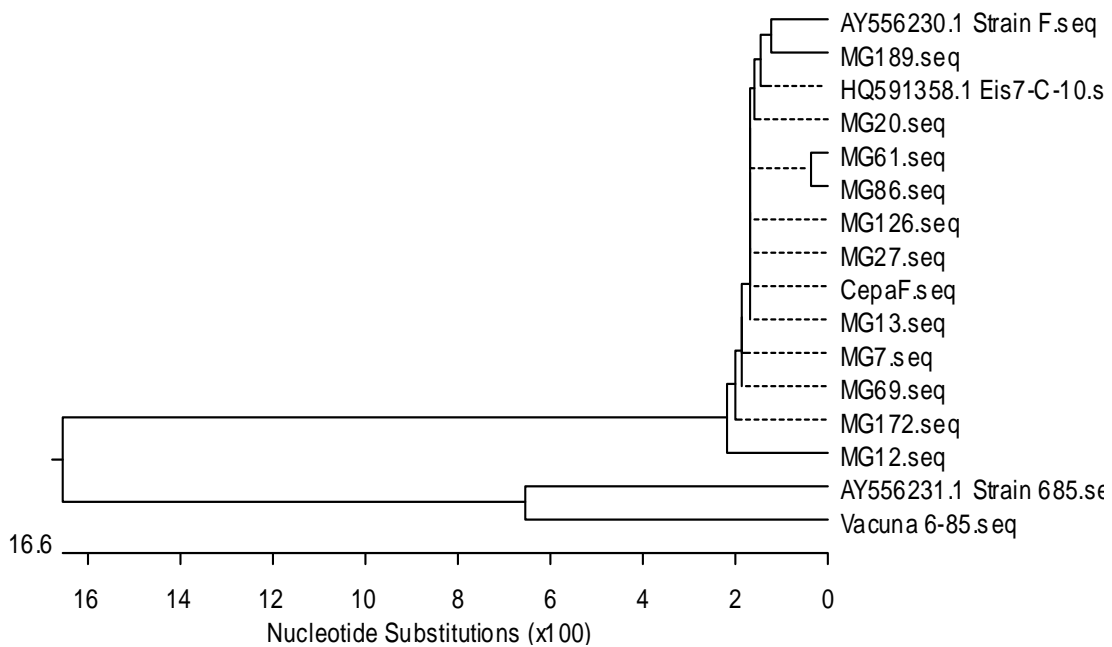
Hidróxido de sodio	7,5 g
Formaldehido al 37 %	2,5 ml

Anexo 9: Solución de inmortalización de geles

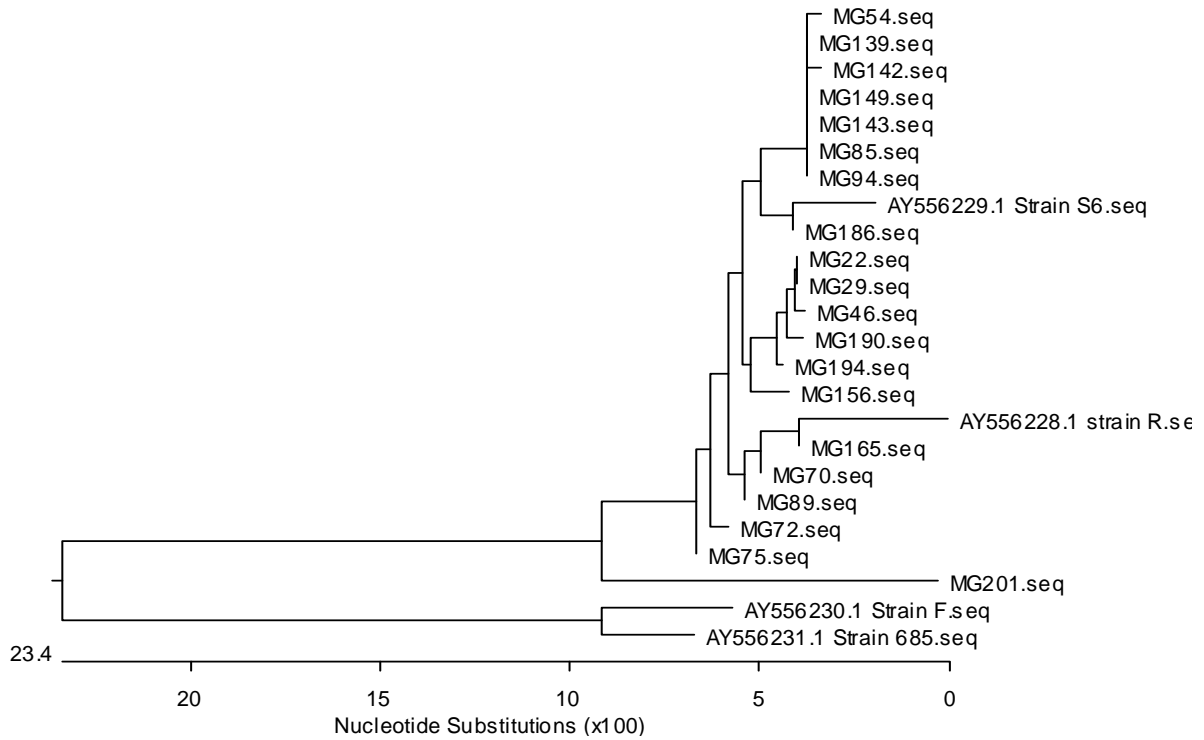
Glicerol	4 ml
Metanol 100 %	45 ml
Completar con agua bidestilada hasta	100 ml

## B. Anexo: Relaciones filogenéticas de secuencias de MG y MS

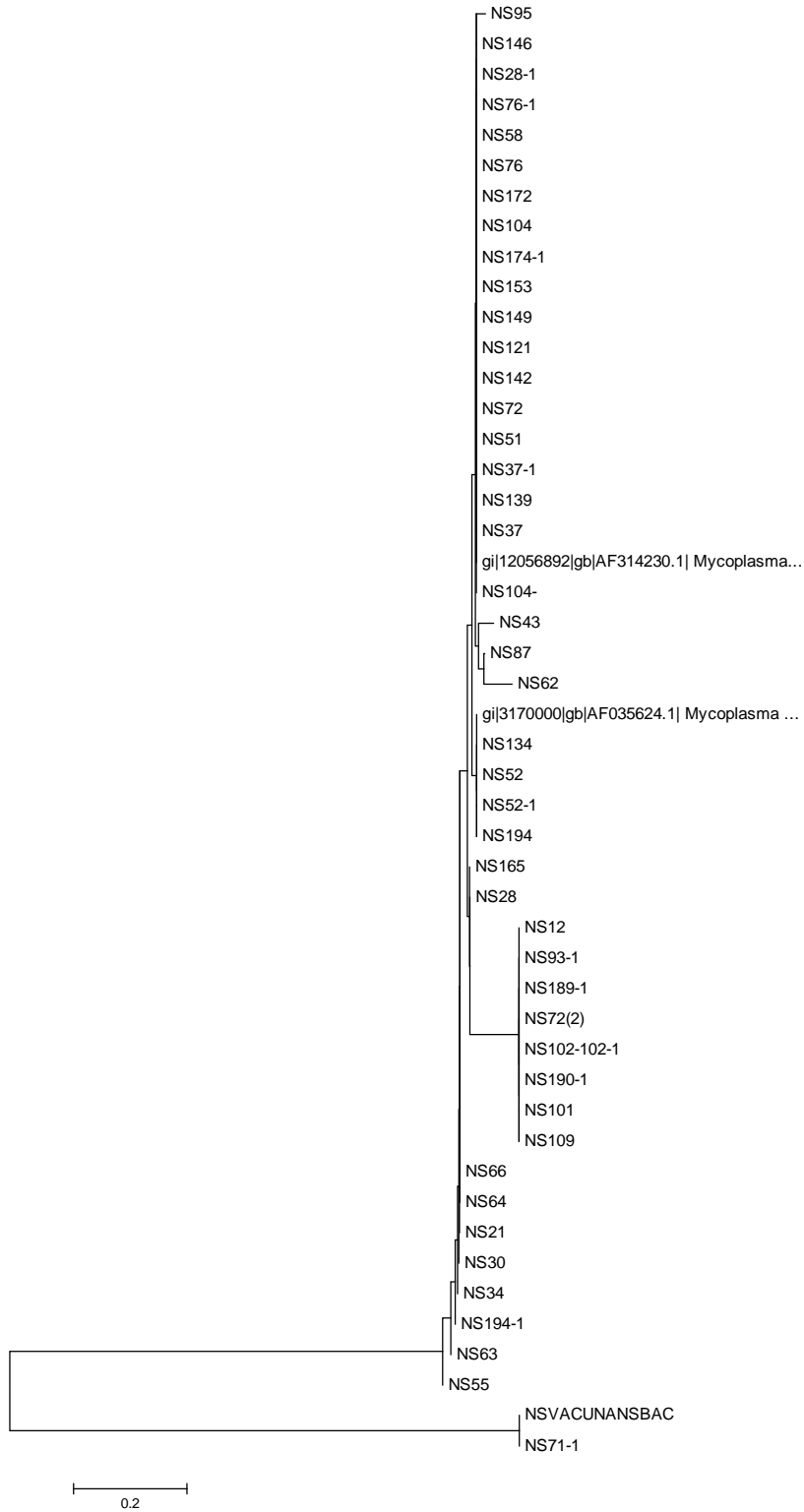
Relación Filogenética de muestras con Patrón RFLP 1 de MG o patrón de cepa F



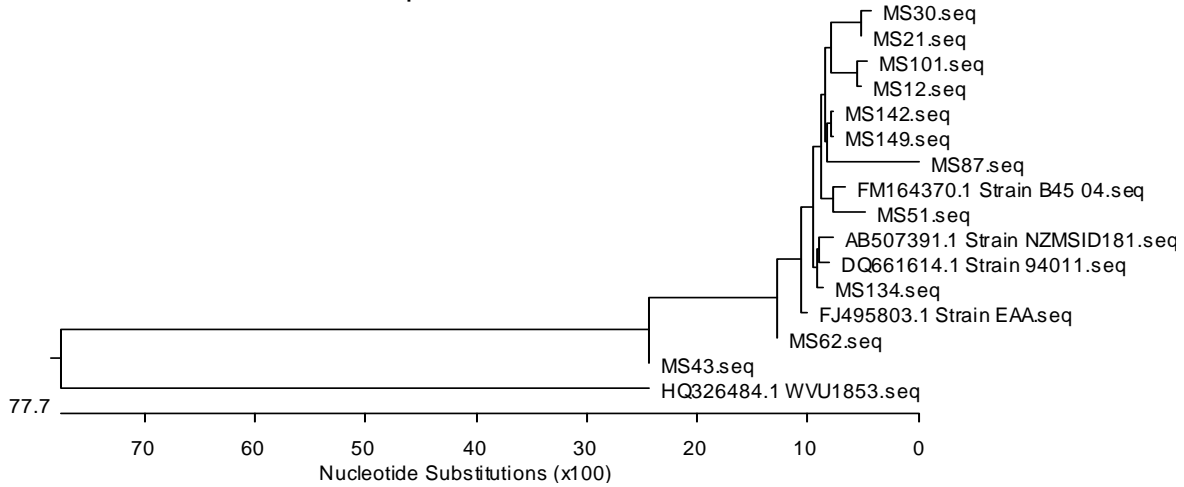
Relación Filogenética muestras con Patrón RFLP 2 de MG o patrón de cepa de campo



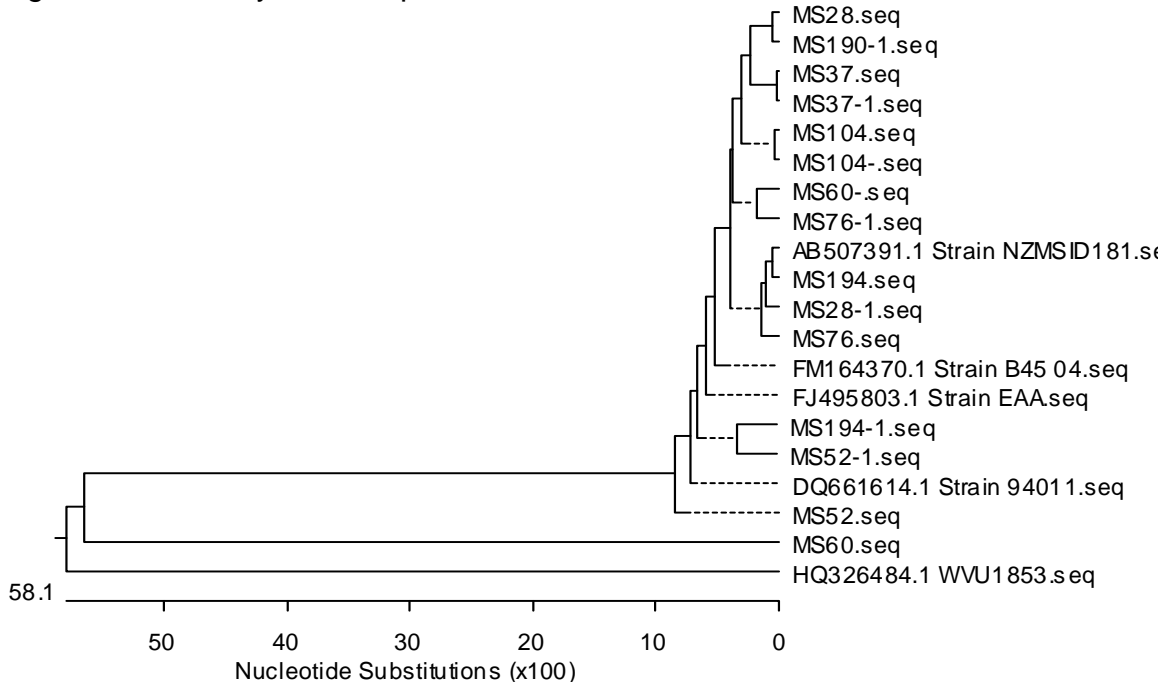
Relación filogenética de las muestras positivas a MS. Se observan clúster definidos.



Relación filogenética entre las muestras positivas a MS seleccionadas de los diferentes clúster con las cepas de referencia



Relación filogenéticas de purificados de muestras con doble banda en geles de agarosa. Se incluyen las cepas de referencia





## Bibliografía

ABD-EL-MOTELIB, T., KLEVEN, S. A comparative study of *Mycoplasma Gallisepticum* vaccines in young chickens. *Avian Dis* 37, 981-987. 1993.

ASNANI, P., AGARWAL, S. Serotyping of Avian *Mycoplasma* Species in India. *Applied Microbiology* 27(6), 997-1000. 1974.

BÉJAOUÏ, A., GUÉRIRI, I., MOHAMMED, R., ABDELMOUMEN, B. Characterization of a variant *vlhA* gene of *Mycoplasma synoviae*, strain WVU 1853, with a highly divergent haemagglutinin region. *BMC Microbiology* 10(6), 1-9. 2010.

BENCINA, D. Haemagglutinins of pathogenic avian mycoplasmas. *Avian Pathol* 31(6), 535-547. 2002.

BENCINA, D. *Mycoplasma* Infections. Biotechnical Faculty University of Ljubjana , 1-11. 2009.

BENCINA, D., BRADBURY, J. Combination of immunofluorescence and immunoperoxidase techniques for serotyping mixtures of *Mycoplasma* species. *J Clin Microbiol* 30(2), 407-410. 1992.

BENCINA, D., DORRER, D., TADINA, T. *Mycoplasma* species isolated from six avian species. *Avian Pathol* 16, 653-664. 1987.

BENCINA, D., NARAT, M., BIDOVEC, A., ZORMAN-ROJS, O. Transfer of maternal immunoglobulins and antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* to the allantoic and amniotic fluid of chicken embryos. *Avian Pathol* 34(6), 463-472. 2005.

BORGES, F., GODOY, A., VALLE, A. Disminución en la producción de huevos por micoplasmosis en granjas del estado de Aragua. *Zootecnia Trop* 17, 261-276. 1999.

BORJA, J., OLIVERA, M., MONTOYA, F., GONZALEZ, C., HERRERA, A. Diagnóstico por PCR de *Mycoplasma gallisepticum* en sistemas de producción de huevo de mesa en el departamento de Antioquia. *Rev Colomb Cienc Pec* 22(3), 479. 2009.

BRADBURY, J., MCCLENAGHAN, M. Detection of Mixed Mycoplasma Species. *J Clin Microbiol* 16(2), 314-318. 1982.

BRANTON, S., LEIGH, S., PURSWELL, J., EVANS, J., COLLIER, S., OLAREWAJU, H., PHARR, G. A Chronicle of serologic response in commercial layer chickens to vaccination with commercial F strain *Mycoplasma gallisepticum* vaccine. *Avian Dis* 54(3), 1108-1111. 2010.

BRANTON, S., LEIGH, S., PURSWELL, J., OLAREWAJU, H., COLLIER, S. Effect of Selected Water Temperatures Used in *Mycoplasma gallisepticum* Vaccine Reconstitution on Titer at Selected Time Intervals. *Avian Dis* 52, 291-296. 2008.

BROWNING, G., MARKHAN, P. Determination of the Genomic Sequence of *Mycoplasma Gallisepticum*. 1-13. Rural Industries Research and Development Corporation. 2004.

BUIM, M., BUZINHANI, M., YAMAGUTI, M., OLIVEIRA, R., METTIFOGO, E., UENO, P., TIMENETSKY, J., SANTELLI, G., PIANTINO, A. *Mycoplasma synoviae* cell invasion: elucidation of the Mycoplasma pathogenesis in chicken. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 34, 41-47. 2011.

BUIM, M., METTIFOGO, E., TIMENETSKY, J., KLEVEN, S., FERREIRA, A. Epidemiological survey on *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* by multiplex PCR in commercial poultry. *Pesq.Vet.Bras.* 29(7), 552-556. 2009.

BUSTOS, F. Prevalencia serológica para algunas enfermedades en pollos de engorde. *Sistemas de producción avícola*, ICA, 246-255. 1988. .

BUTCHER, G. *Mycoplasma gallisepticum* - A Continuing Problem in Commercial Poultry. Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida. VM 130. 2002

BUYUKTANIR, O., YILDIRIM, T., YAKICIER, C., GENÇ, O., YURDUSEV, N. A recombinant PvpA protein-based diagnostic prototype for rapid screening of chicken *Mycoplasma gallisepticum* infections. *Vet.Microbiol.* 129, 139-149. 2008.

CERDÁ, R. Medidas de Prevención y Control de la Micoplasmosis en Latinoamérica. XX Congreso Latinoamericano de Avicultura, 111-124. 2007.

CERDÁ, R., XAVIER, J., PETRUCCELLI, M., ETCHEVERRYGARAY, M. Aislamiento de *Mycoplasma synoviae* en pollos parrilleros y gallinas reproductoras. Primera comunicación en la República Argentina. *Analecta Veterinaria* 18(1), 41-46. 1998.

CHARLESTON, B., GATE, J., AITKEN, I., REEVE-JOHNSON, B. Assessment of the efficacy of tilmicosin as a treatment for *Mycoplasma gallisepticum* infections in chickens. *Avian Pathol* 27, 190-195. 1998.

CHIRINOS, B., ICOCHEA, E., GAVIDIA, C., NOÉ, N. Evaluación de la prueba de inhibición de la hemaglutinación vs. ELISA para la detección de anticuerpos contra *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae*. *Rev.investig.vet.Perú* 11(1), 40-44. 2000.

CHRISTENSEN, N., YAVARI, C., MCBAIN, A., BRADBURY, J. Investigations into the survival of *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasmasynoviae* and *Mycoplasma*

*iovae* on materials found in the poultry house environment. Avian Pathol 23(1), 127-143. 1994.

COLAS, M., MERINO, A., SANTANA, Y., MIRANDA, Y., BACALLAO, N., LOBO, E., VEGA, A. Serological study of agents associated to chronic respiratory syndrome in laying hens. Biotecnología Aplicada 27, 232-236. 2010.

COLLIER, S., PHARR, G., BRANTON, S., EVANS, J., LEIGH, S., FELFOLD, B. Initial Proteomics Analysis of Differentially Expressed Proteins from *Mycoplasma gallisepticum* Vaccine Strains ts-11 and F Detected by Western Blotting. Int.J.Poult.Sci 5(4), 330-336. 2006.

COLMENARES, M., LATORRE, S. Determinacion serologica de anticuerpos contra micoplasmas patogenos, *Salmonella pollorum* y presencia de anticuerpos vacunales de Newcastle en reproductores ( Tesis ). Universidad del Tolima. 1987.

CORREDOR, A., RUEDA, N., CORTAZAR, M. Determinación de anticuerpos de la cepa F de mycoplasma gallisepticum en progenies procedentes de reproductoras de pollo de engorde vacunadas y no vacunadas. Pontificia Universidad Javeriana. 1993.

DOMANSKA-BLICHARZ, K., TOMCZYK, G., MINTA, Z. Comparison of different molecular methods for detection of Mycolasma gallisepticum. Bull Vet Inst Pulawy 52, 529-532. 2008.

DUFOUR-GESBERT, F., DHEILLY, A., MAROIS, C., KEMPF, I. Epidemiological study on Mycoplasma synoviae infection in layers. Vet.Microbiol. 114, 148-154. 2006.

EL GAZZAR, M., LAIBINIS, V., FERGUSON-NOEL, N. Characterization of a ts-11-like *Mycoplasma gallisepticum* Isolate from Commercial Broiler Chickens. Avian Dis 55(4), 569-574. 2011.

ELFAKI, M., KLEVEN, S., JIN, L., RAGLAND, W. Sequential intracoelomic and intrabursal immunization of chickens with inactivated *Mycoplasma gallisepticum* bacterin and iota carrageenan adjuvant. *Vaccine* 10(10), 655-662. 1992.

ELFAKI, M., KLEVEN, S., JIN, L., RAGLAND, W. Protection against airsacculitis with sequential systemic and local immunization of chickens using killed *Mycoplasma gallisepticum* bacterin with iota carrageenan adjuvant. *Vaccine* 11(3), 311-317. 1993.

EVANS, J., LEIGH, S. Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* Vaccine Strains ts-11 and 685 from Commonly Used *Mycoplasma gallisepticum* Challenge Strains by PCR. *Avian Dis* 52, 491-497. 2008.

EVANS, J., LEIGH, S., BRANTON, S., COLLIER, S., PHARR, G., BEARSON, S. *Mycoplasma gallisepticum*: current and developing means to control the avian pathogen. *J Appl Poult Res* 14, 757-763. 2005

EVANS, J., THORNTON, D., BRANTON, S. Diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* from a Broiler Breeder Flock: Comparison of Three Diagnostics Methods. *Int.J.Poult.Sci* 8(2), 104-107. 2009.

FEBERWEE, A., MEKKES, D., KLINKENBERG, D., VERNOOIJ, J., GIELKENS, A., STEGEMAN, J. An experimental model to quantify horizontal transmission of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Pathol* 34(4), 355-361. 2005.

FEBERWEE, A., LANDMAN, W., BANNISEHT-WYSMULLER, T., KLINKENBERG, D., VERNOOIJ, J., GIELKENS, A., STEGEMAN, J. The effect of a live vaccine on the horizontal transmission of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Pathol* 35(5), 359-366. 2006.

FENAVI. Censo Nacional Avicola. [www.fenavi.org](http://www.fenavi.org) . 2009.

FIORENTIN, L., MORES, M., TREVISOL, I., ANTUNES, S., COSTA, J., SONCINI, R., VIEIRA, N. Test Profiles of Broiler Breeder Flocks Housed in Farms with Endemic *Mycoplasma synoviae* Infection. Braz J Poult Sci 5(1), 37-43. 2003.

FONSECA, MM., ALARCON, FJ., VASCONCELOS, AT., AGNEZ-LIMA, LF. A model for the RecA protein of *Mycoplasma synoviae*. Genet.Mol.Biol. 30(1), 290-295. 2007.

GARCÍA, M., IKUTA, N., LEVISOHN, S., KLEVEN, S. Evaluation and Comparison of Various PCR Methods for Detection of *Mycoplasma gallisepticum* Infection in Chickens. Avian Dis 49(1), 125-132. 2005.

GAUNSON, J., PHILIP, C., WHITHEAR, K., BROWNING, G. The cellular immune response in the tracheal mucosa to *Mycoplasma gallisepticum* in vaccinated and unvaccinated chickens in the acute and chronic stages of disease. Vaccine 24, 2627-2633. 2006.

GERCHMAN, I., LYSNYANSKY, I., PERK, S., LEVISOHN, S. In vitro susceptibilities to fluoroquinolones in current and archived *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* isolates from meat-type turkeys. Vet.Microbiol. 131, 266-276. 2008.

GHARAIBEH, S., AL ROUSSAN, D. The use of Molecular techniques in isolation and characterization of *Mycoplasma gallisepticum* from commercial chickens in Jordan. Int.J.Poult.Sci. 7(1), 28-35. 2008.

HAGHIGHI-KHOSHKHOO, P., MASOOD ROOHI, G., INANLO, J., MASOUMI, M., SAMI-YOUSEFI, P. Seroprevalence of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* infection in the commercial layer flocks of the Centernorth of Iran. Afr J Microbiol Res 5(18), 2834-2837. 2011.

HAMMOND, P. P., RAMIRES, A. S., MORROW, C. J., BRADBURY, J. M. Development and evaluation of an improved diagnostic PCR for *Mycoplasma*

*synoviae* using primers located in the haemagglutinin encoding gene *vlhA* and its value for strain typing. *Vet.Microbiol.* 136, 61-68. 2009.

HARADA, K., KIJIMA-TANAKA, M., UCHIYAMA, M., YAMAMOTO, R., OISHI, K., ARAO, M., TAKAHASHI, T. Molecular typing of Japanese field isolates and live commercial vaccine strain of *Mycoplasma synoviae* using improved pulsed-field gel electrophoresis and *vlhA* gene sequencing. *Avian Dis* 53(4), 538-543. 2012.

HERNÁNDEZ, Y., LOBO, E., MARTÍNEZ, S., ZAMORA, L. Evaluación de diferentes métodos de extracción de ADN de micoplasmas para su empleo en el diagnóstico por PCR. *Rev Salud Anim* 31(2), 108-114. 2009.

HNATOW, L., KEELER, C., TESSMER, L., CZYMMEK, K., DOHMS, J. Characterization of MGC2, a *Mycoplasma gallisepticum* Cytadhesin with homology to the *Mycoplasma pneumoniae* 30-Kilodalton Protein P30 and *Mycoplasma genitalium* P32. *Infection and Immunity* 66(7), 3436-3442. 1998.

HONG, Y; GARCÍA, M.; LEITING, V.; BENCINA, D.; DUFOUR-ZABALA, L.; ZAVALA, G.; KLEVEN, S. Specific detection and typing of *Mycoplasma synoviae* strains in poultry with PCR and DNA sequence analysis targeting the hemagglutinin encoding gene *vlhA*. *Avian Dis* 48, 606-616. 2004

HONG, Y., GARCIA, M., LEVISOHN, S., SAVELKOUL, P., LEITING, V., LYSNYANSKY, I., LEY, D., KLEVEN, S. Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* Strains Using Amplified Fragment Length Polymorphism and Other DNA-Based Typing Methods. *Avian Dis* 49, 43-49. 2005.

HOSSAIN, K., ALI, M., HAQUE, M. Seroprevalence of *Mycoplasma gallisepticum* in chicken in the greater Rajshahi district of Bangladesh. *Bangladesh J Vet Med* 5(1-2), 9-14. 2007.

JARQUIN, R., SCHULTZ, J., HANNING, I., RICKE, S. Development of a Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for the Simultaneous Detection of

*Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* Under Industry Conditions. Avian Dis 53, 73-77. 2009.

JEFFERY, N., BROWNING, G., NOORMOHAMMADI, A. H. Organization of the *Mycoplasma synoviae* WVU 1853<sup>T</sup> *vlhA* gene locus. Avian Pathol 35(1), 53-57. 2006.

JIANG, H., CHEN, J., YAN, H., LI, X., CHEN, Z., ZENG, Z. Molecular Variability of DR-1 and DR-2 Within the *pvpA* Gene in *Mycoplasma gallisepticum* Isolates. Avian Dis 53, 124-128. 2009.

JORDAN, F. Avian mycoplasma and pathogenicity - A review. Avian Pathol 4(3), 165-174. 1975.

JORDAN, F., Kulasegaram, P. Serological Tests for the Detection of Antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* in Chickens and Turkeys. Journal of Hygiene 66, 249-267. 1968.

KAHYA, S., TEMELLI, S., EYIGOR, A., TAYFUN, K. Real-time PCR culture and serology for the diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* in chicken breeder flocks. Vet. Microbiol. 144(3-4), 319-324. 2010.

KEMPF, I. DNA amplification methods for diagnosis and epidemiological investigations of avian mycoplasmosis. Avian Pathol 27(1), 7-14. 1998.

KEMPF, I., GESBERT, F. Comparison of serological tests for detection of *Mycoplasma gallisepticum* antibodies in eggs and chicks hatched from experimentally infected hens. Vet. Microbiol. 60, 207-213. 2009.

KISS, I., MATIZ, K., KASZANYITZKY, E., CHAVEZ, Y., JOHANSSON, K. Detection and identification of avian mycoplasmas by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism assay. Vet. Microbiol. 58, 23-30. 1997.



KLEVEN, S. Mycoplasmas in the Etiology of Multifactorial Respiratory Disease. *Poult.Sci.* 77, 1146-1149. 1998.

KLEVEN, S., Micoplasmosis. In: B. W. Calneck (Ed.), *Enfermedades de las Aves. Manual Moderno*, pp. 195-239.2000.

KLEVEN, S., *Mycoplasma synoviae* infection. In: Y. Saif, H. Barnes, J. Glisson, A. Fadly, L. McDougald, D. Swayne (Eds.), *Diseases of Poultry*. Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp. 224-233.2003.

KLEVEN, S. Prevention and control of avian mycoplasmas. *Avian Insight* 2(5), 1-3. 2005.

KLEVEN, S. Control de Micoplasma. Situación Actual. AMEVEA. XXVII Seminario Avícola Internacional. 2006.

KLEVEN, S. Control of avian *Mycoplasma* infections in commercial poultry. *Avian Dis* 52, 367-374. 2008.

KLEVEN, S., FULTON, R. M., GARCIA, M., IKUTA, N., LEITING, V., LIU, T., LEY, D. H., OPENGART, K. N., ROWLAND, G. N., WALLNER-PENDLETON, E. Molecular Characterization of *Mycoplasma gallisepticum* Isolates from Turkeys. *Avian Dis* 48(3), 562-569. 2004.

KLEVEN, S., HOFACRE, C. Current implications in the field of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* on broilers and laying hen production. *The Poultry Informed Professional* (90), 1-3. 2006.

KOJIMA, A., TAKAHASHI, T., KIJIMA, M., OGIKUBO, Y., NISHIMURA, M., NISHIMURA, S., TAMURA, Y. Detection of *Mycoplasma* in Avian Live Virus Vaccines by Polymerase Chain Reaction. *Biologicals* 25, 365-371. 1997.

LEY, DH., MCLAREN, JM., MILES, AM., BARNES, J., HEINS MILLER, S., FRANZ, G. Transmissibility of Live *Mycoplasma gallisepticum* Vaccine Strains ts-

11 and 6/85 from vaccinated Layer Pullets to Sentinel Poultry. Avian Dis 41(1), 187-194. 1997.

LIU, T., GARCIA, M., LEVISOHN, S., YOGEV, D., KLEVEN, S. Molecular Variability of the Adhesin-Encoding Gene *pvpA* among *Mycoplasma gallisepticum* Strains and Its Application in Diagnosis. J Clin Microbiol 39(5), 1882-1888. 2001.

LOBO, E., CHAVEZ, Y., AGUERO, J., MARTÍNEZ, S., MOSCOSO, H., GARCÍA, M., KLEVEN, S. Aislamiento e identificación de *Mycoplasma pullorum* como cepa de nuevo reporte en Cuba. Revista Cubana de Ciencia Avícola 26, 103-109. 2002.

LOCKABY, S., HOERR, F., LAUERMAN, L., SMITH, B., SAMOYLOV, A., TOIVIO-KINNUCAN, M., KLEVEN, S. Factors Associated with Virulence of *Mycoplasma synoviae*. Avian Dis 43, 251-261. 1999.

MARDASSI, B., BÉJAOU, A., OUSSAEIF, L., MLIK, B., AMOUNA, F. A Recombinant Antigen-Based ELISA for the Simultaneous Differential Serodiagnosis of *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma meleagridis* infections. Avian Dis 52, 214-221. 2008.

MAY, M., BROWN, D. Diversity of expressed *vlhA* adhesin sequences and intermediate hemagglutination phenotypes in *Mycoplasma synoviae*. JBacteriol193(9), 2116-2121. 2011.

MCMARTIN, D. A., KHAN, M. I., FARVER, T. B., CHRISTIE, G. Delineation of the lateral spread of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. Avian Dis 31, 814-819. 1987.

MOSSOS, N. Micoplasma. Foro Nacional Avícola . 2000.

NASCIMENTO, E., PEREIRA, V., NASCIMENTO, M., BARRETO, M. Avian Mycoplasmosis Update. Braz J Poult Sci 7(1), 1-9. 2009.

NASCIMENTO, E., YAMAMOTO, R., KHAN, M. *Mycoplasma gallisepticum* F-Vaccine Strain-Specific Polymerase Chain Reaction. Avian Dis 37(1), 203-211. 1993.

NICHOLAS, R., AYLING, R., MCAULIFFE, L. Vaccines for Mycoplasma diseases in animals and man. J.Comp.Path 140, 85-96. 2009.

NIEVES, M., ICOCHEA, E., GONZALES, R., FALCÓN, N. Seroprevalencia de *Mycoplasma synoviae* en pavos reproductores criados en la zona de Lima, Peru. Rev.investig.vet.Perú 2, 232-234. 2010.

OIE. Micoplasmosis Aviar - *Mycoplasma gallisepticum*. OIE. Manual de la OIE sobre animales terrestres , 905-919. 2004.

OIE. Micoplasmosis aviar (*Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*). OIE. Manual OIE sobre animales terrestres , 1-17. 2008.

PAPASIZI, L., GORTON, T., KUTISH, G., MARKHAN, P., BROWNING, G., NGUYEN, D., SWARTZELL, S., MADAN, A., MAHARIAS, G., GEARY, S. The complete genome sequence of the avian pathogen *Mycoplasma gallisepticum* strain Rlow. Microbiology 149, 2307-2316. 2003.

PAPASIZI, L., SILBART, L. K., FRASCA, S., ROOD, D., LIAO, X., GLADD, M., JAVED, M. A., GEARY, S. J. A modified live *Mycoplasma gallisepticum* vaccine to protect chickens from respiratory disease. Vaccine 20, 3709-3719. 2002.

POLLACK, JD., BEAMAN, KD., TRYON, VV. Supplement to current insights in Mycoplasma. Yale Journal of Biology and Medicine 57, 891-908. 1984.

POULTRY TECHNICAL SERVICE TEAMSCHERING PLOUGH. Control of *Mycoplasma Gallisepticum* in layers. International Poultry Production 13(1), 21-22. 2004.

RAMIREZ, A. S., NAYLOR, C., PITCHER, D. G., BRADBURY, J. High inter-species and low intra-species variation in 16S–23S rDNA spacer sequences of

pathogenic avian mycoplasmas offers potential use as a diagnostic tool. Vet.Microbiol. 128, 279-287. 2008.

RAVIV, Z., KLEVEN, S. The Development of Diagnostic Real-Time TaqMan PCRs for the Four Pathogenic Avian Mycoplasmas. Avian Dis 53, 103-109. 2009.

RAZIN, S., YOGEV, D., NAUD, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Microbiol.Mol.Biol.Rev. 62, 1094-1156. 1998.

REINHARDT, A. K., GAUTIER-BOUCHARDON, A. V., GICQUEL-BRUNEAU, M., KOBISCH, M., KEMPF, I. Persistence of *Mycoplasma gallisepticum* in chickens after treatment with enrofloxacin without development of resistance. Vet.Microbiol. 106, 129-137. 2005.

RHOADES, K. R., KELTON, W. H., HEDDLESTON, K. L. Serologic, Pathologic, and Symptomatic Aspects of Mycoplasmosis of Turkeys. Can JComp Med 29, 169-172. 1965.

RIOS, P., RAMIREZ, A., ICOCHEA, E., NOÉ, N., LEVISOHN, S. Detección de *Mycoplasma synoviae* (MS) y anticuerpos anti-MS en embriones de gallinas naturalmente infectadas. Rev.investig.vet.Perú 5-6(1), 1-7. 2005.

RUIZ, J. Actualidades en el manejo y control de la micoplasmosis aviar. XXIV Seminario Internacional Avícola . 2003. AMEVEA.

SAMBROOK & RUSSEL, Appendix 9: Detection Systems. In: Sambrook & Russel (Ed.), Molecular Cloning - A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 2101-2102.2001.

SANCHEZ, B., REDONDO, H., BRANDY, L., MARTÍNEZ, A., RODRIGUEZ, M. Detección de cepas de *Mycoplasma gallisepticum* por PCR a tiempo real sobre los genes LP y *mgc2*, en swabs traqueales con PBS y medio Frey. XLII Symposium Científico de Avicultura . 2005a.

SÁNCHEZ, B., REDONDO, H., RODRIGUEZ, M. Diferenciación de cepas vacunales de *Mycoplasma gallisepticum* 6/85 (Like-6/85), en muestras de campo mediante AP-PCR sobre genes PMGA, RFLP-PCR y secuenciación sobre genes Lp y mgc2. XLII Symposium Científico de Avicultura . 2005b.

SÁNCHEZ, L., PÉREZ, T., ROSADO, I., MARTINEZ, S., CORREA, H., PÉREZ, A., RIVERÓN, Y. Estudio preliminar de la emulsion adyuvante Montanide Isa 50 y el antígeno de *Mycoplasma gallisepticum*. Revista de Salud Animal 26(2), 213-215. 2004.

SPRYGIN, A., ANDREYCHUK, D., KOLOTILOV, A., VOLKOV, M., RUNINA, I., MUDRAK, N., BORISOV, A., IRZA, V., DRYGIN, V., PEREVOZCHIKOVA, N. Development of a duplex real-time TaqMan PCR assay with an internal control for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in clinical samples from commercial and backyard poultry. Avian Pathol 39(2), 99-109. 2010.

SUZUKI, K., OKADA, H., ITOH, T., TADA, T., MASE, M., NAKAMURA, K., KUBO, M., TSUKAMOTO, K. Association of increased pathogenicity of Asian H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses in chickens with highly efficient viral replication accompanied by early destruction of innate immune responses. J.Virol 83(15), 7475-7486. 2009.

TAYFUN, K., EYIGOR, A. Real-Time Polymerase Chain Reaction for Detection of *Mycoplasma gallisepticum* in Chicken Trachea. Avian Dis 47, 712-717. 2003.

URIBE, A. Diagnóstico y control de la micoplasmosis aviar. XXVII Seminario Avícola Internacional.AMEVEA. 2006.

VENTURA, C., RAMIREZ, G., VERA, V. Detección y diferenciación de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* mediante la técnica de PCR a partir de hisopos traqueales de aves con síntomas respiratorios. Acta biol.Colomb. 17(3), 525-536. 2012.

WETZEL, A., LEFEVRE, K., RAVIV, Z. Revised *Mycoplasma synoviae* *vlhA* PCRs. Avian Dis 54(4), 1292-1297. 2010.

WHITHEAR, K. Reviews of Infectious Diseases. Current Topics in Mycoplasmology , 237-277. 1982.

WHITHEAR, K., HARRIGAN, K., KLEVEN, S. Standardized Method of Aerosol Challenge for Testing the Efficacy of *Mycoplasma gallisepticum* vaccine. Avian Dis 40, 654-660. 1996.