

48



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO ^{2ej.}

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

“DESARROLLO DE LA PRUEBA DE INHIBICION DE
CRECIMIENTO PARA LA IDENTIFICACION DE
Mycoplasma gallisepticum”

A R T I C U L O
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
P R E S E N T A:
CLAUDIA / GONZALEZ PIÑA

ASESOR:

M. EN C. TONATIUH A. CRUZ SANCHEZ

269702

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX. 1998



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

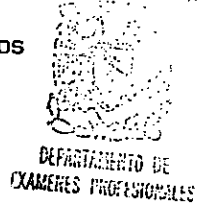


UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de publicación: "Desarrollo de la prueba de Inhibición de Crecimiento para la identificación de micoplasma gallicantus"

que presenta la pasante: Claudia González Piña
con número de cuenta: 3841252-7 para obtener el TITULO de:
Médica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 30 de enero de 1998

PRESIDENTE DR. Ariel Ortiz Muñoz

VOCAL N.º 1 C. Tonatiah Cruz Sánchez

SECRETARIO N.º 1 C. Alejandro Martínez Rodríguez

1er. SUPLENTE MVD. Silvano Trojo Muñoz

2do. SUPLENTE ing. Raúl Badilla Rodríguez

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas y ser parte primordial de mi formación profesional.

Al laboratorio de Microbiología de la Sección de Ciencias de la Salud Animal por facilitar equipo y material requerido.

Al M. en C. Tonatiuh A. Cruz Sánchez por su tiempo y paciencia dedicados durante el asesoramiento.

A la M.V.Z. Luz María Ortega Leyva y al M.V.Z. Gilberto Ochoa Uribe por la orientación en algunos procedimientos de laboratorio y apoyo de material.

Al Dr. Ariel Ortiz Muñiz. Por las sugerencias dadas para enriquecer el trabajo y la ayuda desinteresada.

A la M.V.Z. Adriana Garulo, por su valiosa colaboración durante en el desarrollo del presente.

Al M.V.Z. Miguel Angel Cenicerros, por la ayuda brindada para el curso del trabajo.

Al M.V.Z. David Trujillo, por sus conocimientos brindados.

A los miembros del jurado:

M. en C. Alejandro Martínez Rodríguez, M.V.Z. Silvano Trejo Nuñez y M.V.Z. Raúl Radillo Rodríguez. Por el tiempo y sugerencias brindadas durante la revisión del artículo.

A cada una de aquellas personas que de alguna u otra manera hicieron posible con su ayuda la realización de este trabajo.

DEDICATORIAS.

A mis padres y tío:

Margarita Piña Licea.

Reyes González Morán.

José Antonio Piña Licea.

Quienes han confiado y apoyado durante toda mi vida, con cariño.

A mis hermanos: Rigo, Gonzalo, Miguel y Oscar. Con afecto por la gran fuerza espiritual y guía que me han brindado al convivir con ustedes.

A Mary y Paula en su memoria.

A Hugo y César.

A Miriam y Gail a las grandes amigas de tantos años, con quienes he contado en los momentos buenos y malos.

A la familia Aguilar Avila.

A otra amiga excelente Isabel Lázaro por confiar en mí gracias.

A mis amigos: Juana Bocio, Elizabeth, Ivonne, Alejandra, Claudia, Audrey, Miguel, Juana González, Toño, Elena, Gustavo, Rosa y Belém.

A otros amigos muy especiales que me han acompañado incondicionalmente: Conchito y Trico y a dos que me abandonaron inevitablemente Pinpon y Pipis.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Microbiología de la Sección de Ciencias de la Salud Animal, como parte de los trabajos de investigación pertenecientes a la Cátedra: Producción de antígenos y antisueros para uso diagnóstico de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se presentó en el XV Congreso Latinoamericano de Avicultura, celebrado en Cancún Quintana Roo, México.

RESUMEN.

Se obtuvo suero y pulmones de 20 pollos de engorda, que mostraban afección respiratoria. A los sueros se les realizó la prueba de Aglutinación en Placa, utilizándose antígeno de *Mycoplasma gallisepticum* cepa S6 de Adler (Lab. Intervet). Las muestras pulmonares fueron maceradas en medio líquido de Frey en condiciones asépticas estériles, posteriormente se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 minutos. Se tomó una alícuota de 0.3 ml y se realizaron las diluciones logarítmicas hasta 10^3 en tubos estériles con medio líquido de Frey. Los tubos fueron incubados a 37° C durante 7 días; después se sembraron en cajas de petri con medio sólido de Frey e incubaron a 37° C durante 7 días en condiciones de microaerofilia es decir en una atmósfera de 10% de CO₂, considerándose positivos aquellos cultivos que presentaban colonias con morfología característica de "huevo estrellado" al momento de observarse en el microscópio estereoscópico. Se aislaron micoplasmas de doce muestras pulmonares.

Para la producción de suero hiperinmune fueron inoculados dos conejos Nueva Zelanda de 2 kg de peso con una preparación de *Mycoplasma gallisepticum* cepa A5969, adyuvante completo de Freund y penicilina. El calendario de inoculación fué el siguiente: día 0, 15, 22, 36 y 43; el día 50 se sacrificaron los conejos y se obtuvo el suero hiperinmune; el día 15 se obtuvo 1 ml de suero. Con el suero obtenido el día 15 y el día 50 se realizó la técnica de Microaglutinación, para determinar el título de anticuerpos presentes después de la primera y última inoculación. Después de la primera inoculación se tuvo en ambos conejos un título de 1:40; después de la última inoculación el suero del conejo No. 1 alcanzó título de 1:1280, mientras que el suero del conejo No. 2 tuvo título de 1:320.

En la prueba de Inhibición de Crecimiento se emplearon las cepas de micoplasmas obtenidas en el aislamiento. Se sembraron por duplicado en medio sólido de Frey y sobre la superficie del agar se colocaron discos de papel filtro Watmann no. 1 impregnados con suero hiperinmune contra *Mycoplasma gallisepticum* o *Mycoplasma synoviae* e incubó a 37° C durante 7 días en condiciones de microaerofilia. Se consideró como resultado positivo la observación de un halo de inhibición de crecimiento alrededor del disco de un diámetro no menor de 5 mm. Como control positivo se empleó la cepa de *Mycoplasma gallisepticum* A5969 y como control negativo la cepa de *Mycoplasma synoviae* WVU 1853. Para la realización de esta prueba se empleó el suero hiperinmune

contra *Mycoplasma gallisepticum* y suero hiperinmune contra *Mycoplasma synoviae* proporcionado por la Sección de Ciencias de la Salud Animal. Por medio de la prueba se identificaron 4 cepas como *Mycoplasma gallisepticum* y 3 como *Mycoplasma synoviae*.

En México son muy limitadas las facilidades de laboratorio para el aislamiento de micoplasmas, debido a la carencia de antisueros y cepas de referencia disponibles por lo que el recurso más utilizado son las técnicas serológicas como la de Inhibición de la Hemoaglutinación y ELISA. La prueba de Inhibición de Crecimiento puede ser de gran ayuda en el diagnóstico e identificación de micoplasmas de origen aviar.

INTRODUCCION.

Los micoplasmas son los organismos más pequeños de vida libre (miden de 125-250 nm), para su crecimiento necesitan de complejos requerimientos nutricionales. Carecen de pared celular por lo cual son pleomórficos y son resistentes a la penicilina. (2,3,4).

Los micoplasmas están incluidos en la clase *Mollicutes* (molis: blando, cutis: piel), orden *Mycoplasmatales*, familia *Mycoplasmataceae*. La ausencia de pared celular ha sido utilizada como la base primaria para incluirlos en la clase mencionada anteriormente y además la razón de la morfología colonial característica de "huevo frito" que se observa en el medio sólido. (2,3)

Mycoplasma gallisepticum se transmite principalmente a través de ovario u oviducto hacia el huevo (transmisión vertical) y en raras ocasiones por contacto directo (transmisión horizontal). Influyen algunos factores para que se complique el cuadro como lo son los agentes desencadenantes como virus respiratorios vacunales y de campo (Enfermedad de Newcastle, Bronquitis Infecciosa y Laringotraqueítis) y agentes bacterianos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus sp.* (6)

En el pollo la Enfermedad Crónica Respiratoria tiene de manera típica un largo periodo de incubación que va de 1 a 3 semanas y evolución prolongada. Se acompaña de estertores traqueales, descarga nasal, lagrimeo, estornudos y tos. Disminuye el consumo de alimento, las aves pierden peso y sueñen bajar la producción de huevo. Las lesiones macroscópicas se relacionan con la existencia de exudados mucoides o mucopurulentos en la tráquea, los bronquios, los sacos alveolares y nasales, es decir hay conjuntivitis, traqueítis, congestión de vías respiratorias altas y bajas, epitelio traqueal engrosado,

neumonía, aerosaculitis, bursitis de la quilla y salpingitis. Vistos al microscópio las mucosas están engrosadas , son hiperplásicas y se encuentran infiltrados por células mononucleares. (5)

Para efectuar el diagnóstico las lesiones macroscópicas e histológicas no son patognomónicas de infección por *Mycoplasma gallisepticum* , por lo que el aislamiento del organismo y examen serológico es necesario. (4)

Una de las pruebas sencillas y rápidas que se utiliza en diagnóstico es la Prueba de Aglutinación en Placa, esta prueba se puede realizar en campo ya que sólo se requiere del antígeno teñido de *Mycoplasma gallisepticum*, una placa de vidrio y el suero de los pollos sospechosos., las desventajas es que pueden producir falsos positivos o bien reacciones cruzadas. (1,2,7)

Varios medios de cultivo son utilizados para el aislamiento de *Mycoplasma gallisepticum*., estos medios son muy ricos en nutrientes, constan fundamentalmente de una base nutritiva (casi siempre de extracto de corazón), peptonas , extracto de levadura, suero y otros aditivos. Además de vitaminas y oligoelementos, el extracto de levadura tiene una proporción alta de ácido nucleico y de sus precursores. El suero es importante como fuente de ácidos grasos asimilables y no tóxicos, así como de colesterol, los cuales son necesarios sobre todo para la síntesis de la membrana del citoplasma. El suero de equino y de feto bovino son los más idóneos. Como fuente de energía se pueden emplear tanto la glucosa como la arginina. El crecimiento de micoplasmas es relativamente lento (días), en el medio de cultivo se deben de añadir sustancias inhibitoras, habitualmente se utiliza la penicilina y el acetato de talio los cuales no desarrollan actividad sobre los micoplasmas y si contra otros microorganismos que pudieran contaminar el medio de cultivo. (1)

Una vez que las muestras han sido colectadas se siembran en medio líquido e incuban a temperatura de 37° C durante 7 días, posteriormente se debe identificar. Los métodos más comunmente utilizados son: Inhibición de Crecimiento, Inmunodifusión e Inmunofluorescencia, con antisueros específicos y colonias de micoplasmas.(5,7).

El presente trabajo tiene la finalidad de montar la prueba de Inhibición del Crecimiento como herramienta en la identificación de micoplasmas.

MATERIAL Y METODOS.

Obtención de muestras .

Se sacrificaron 20 pollos de engorda con signos sugestivos a Enfermedad Crónica Respiratoria, tomando como muestras suero y pulmones, ambas muestra se conservaron a -20° C hasta su utilización.

Prueba de Aglutinación en Placa.

Los sueros de los pollos fueron sometidos a dicha técnica que consistió en colocar sobre una placa de vidrio limpia una gota de suero y una gota de antígeno de *Mycoplasma gallisepticum* cepa S6 de Adler. (Laboratorio Intervet), se agitó y esperó aproximadamente 2 minutos para obtener resultados, dando como reacción positiva la observación de grumos coloreados de azul.

Obtención de Suero Hiperínmune.

Se inocularon por vía subcutánea 2 conejos Nueva Zelanda de 2 kg de peso con una preparación de *Mycoplasma gallisepticum* cepa A5969, adyuvante completo de Freund y penicilina en una proporción de 1:1. Se empleo el siguiente calendario de inoculación:

El día 0 se inoculó con el preparado de *Mycoplasma gallisepticum* a cada uno de los conejos, así como también se obtuvo suero para evaluar cualitativamente los anticuerpos aglutinantes por medio de la prueba de Aglutinación en Placa.

El día 15 se inocularon y obtuvo suero de los conejos el cual se sometió a la técnica de Microaglutinación (Yamamoto y Ortiz, 1974) , para determinar el título de anticuerpos producidos después de la primera inoculación

Los días 22, 36 y 46 se inocularon a los conejos con el preparado de *Mycoplasma gallisepticum*.

El día 50 se sacrificaron a los dos conejos Nueva Zelanda (previa anestesia con ketamina), mediante sangrado intracardiaco e inhalación de eter hasta su muerte. Se centrifugó la sangre a 2500 rpm durante 15 minutos obteniéndose el suero hiperínmune, al que se le realizó la prueba de Microaglutinación (Yamamoto y Ortiz, 1974) para determinar el título de anticuerpos presentes. Se colocó el suero en viales estériles y se congelaron a -20°C hasta su uso.

Titulación del Suero Hiperinmune. Técnica de Microaglutinación.

Se tituló el Suero Hiperinmune contra *Mycoplasma gallisepticum* mediante la técnica de Microaglutinación (Yamamoto y Ortiz, 1974).

Se utilizó una microplaca de 96 pozos; como inicio se diluyó el suero en una proporción de 1:5 de la siguiente forma: en uno de los pozos de la microplaca se adicionó 80 microlitros de PBS (Solución buffer fosfatada) y 20 microlitros de Suero Hiperinmune contra *Mycoplasma gallisepticum*; posteriormente de la dilución anterior se tomaron 50 microlitros y se colocaron en el primer pozo de una hilera de 12 pozos de la microplaca y se adicionó 50 microlitros de PBS: de esta manera se tuvo en este pozo la dilución en proporción de 1:2 de la dilución 1:5; A partir de esta última dilución se tomaron 50 microlitros que se fueron pasando de pozo en pozo de la microplaca a los cuales previamente se les había adicionado 50 microlitros de PBS esto hasta completar la hilera de 12 pozos de la microplaca, desechándose 50 microlitros del pozo No. 12. A cada pozo se le adicionó 50 microlitros de antígeno diluido 1:10 de *Mycoplasma gallisepticum* cepa S6 de Adler (Lab. Intervet), se cubrió la microplaca con parafilm e incubó en estufa bacteriológica a 37 °C durante 24 horas. Se realizó el procedimiento dos veces. Como control negativo se utilizó suero de equino al que se le realizó el procedimiento antes mencionado. Se consideró como reacción positiva al observar con ayuda de el microscopio estereoscópico la presencia de una malla de aglutinación en el fondo del pozo.

De esta manera el título de la muestra se convirtió en título logarítmico como sigue:

Dilución final del suero.	Título logarítmico.
1:10=1:5*2 ¹	1
1:20=1:5*2 ²	2
1:40=1:5*2 ³	3
1:80=1:5*2 ⁴	4
1:160=1:5*2 ⁵	5
1:320=1:5*2 ⁶	6
1:640=1:5*2 ⁷	7
1:1280=1:5*2 ⁸	8

Dilución final del suero.	Título logarítmico.
1:2560=1.5*2 ⁹	9
1:5120=1.5*2 ¹⁰	10
1:10240=1.5*2 ¹¹	11
1:20480=1.5*2 ¹²	12

(*). Signo por de multiplicación.

La solución buffer fosfatada que se empleó fué preparada de la siguiente forma:

Solución A: en un litro de agua destilada se mezcló 1.38 gr. de fosfato de sodio monobásico y 8.5 gr. de cloruro de sodio.

Solución B: en un litro de agua destilada se agregó 1.42 gr. de fosfato de sodio y 8.5 gr. de cloruro de sodio.

Se mezclaron 280 ml de la solución A con 720 ml de la solución B , se midió el pH y ajustó a 7.2 con una solución preparada de ácido clorhídrico al 5% o bien de hidróxido de sodio al 5% según fuera necesario.

Aislamiento de micoplasmas.

El medio de cultivo que se empleó para el aislamiento de micoplasmas fué el medio de Frey. Algunos ingredientes que constituyen el medio de Frey requirieron ser sometidos a diversos procedimientos antes de ser utilizados para elaborar el medio. El extracto de levadura se requirió preparar a partir de levadura de cerveza para pan. Se disolvió un bloque de 400 gr de levadura de cerveza para pan en 1 litro de PBS calentando a una temperatura de 80° C durante una hora agitando regularmente ; se dejó reposando 24 horas. La levadura se centrifugó a 2500 rpm durante 15 minutos en 4 ocasiones, se midió el pH con un potenciómetro y ajustó a 7.2. Se esterilizó la levadura en filtro millipore con una membrana de 0.22 micras y papel filtro del No. 4. La levadura estéril se colocó en botellas de vidrio para su conservación a -20° C hasta el momento de su utilización.

Para la obtención del suero se sangró a equinos, se centrifugó la sangre a 2500 rpm durante 15 minutos.

El suero fué inactivado a 56° C durante 15 minutos. Se esterilizó el suero en filtro millipore por una membrana de 0.22 micras y papel filtro del No. 4. Se colocó en envases de vidrio estériles y se conservó a -20° C hasta su uso.

Tanto la levadura y el suero después del proceso de filtración se sometieron a la prueba de esterilidad que consistió en incubar a una temperatura de 37° C durante 24 horas.

El medio de Frey se preparó de la siguiente forma: en agua destilada se adicionó medio de PPLO , glucosa, rojo de fenol y ADN, se mezcló y clarificó por calor, se esterilizó en autoclave a 121° C, 15 lb, 15 minutos y se adicionó en forma aséptica la levadura , el suero de equino y la penicilina. El medio líquido de Frey fue distribuido en tubos estériles con tapón de baquelita conteniendo 3 ml de medio cada tubo.

Para la preparación del medio sólido se utilizaron los mismos componentes , sólo que dentro de ellos se utilizó también agar noble. El medio sólido de Frey fué colocado en cajas de vidrio estériles en cantidad de 30 ml cada caja.

En condiciones asépticas se colocaron trozos de muestras pulmonares de pollos con signos sugestivos a la Enfermedad Crónica Respiratoria y 0.5 ml de medio de Frey en morteros, se maceraron las muestras y se sirvieron en tubos de vidrio que previamente contenían 2.5 ml de medio líquido de Frey; se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 minutos, se tomó 0.3 ml del sobrenadante pasando al siguiente tubo con 3 ml de medio líquido de Frey y de aquí a otros dos tubos de la misma forma. Los tubos se incubaron a 37°C durante 7 días ; después se sembraron en medio sólido de Frey e incubaron a 37°C durante 7 días en una atmósfera microaerofílica de 10% de CO₂, se observaron los cultivos con ayuda de un microscópio estereoscópico, considerando aislamiento positivo aquellos que presentaban crecimiento colonial característico de "huevo estrellado" (ver fig. No. 1). Se separaron las colonias en forma aséptica, cortando con una hoja de bisturí estéril el trozo de agar en el que se encontraba la colonia y se colocó en un tubo con medio líquido de Frey, se incubó a 37° C durante 3 días posteriormente se congelaron a -20° C hasta su uso.

Prueba de Inhibición de Crecimiento.

Para la realización de esta técnica se utilizó el suero hiperinmune de título mayor. Las colonias de micoplasmas aisladas se descongelaron, se transfirieron a medio líquido e incubaron a 37° C durante 2 a 4 días , de esta manera se obtuvieron los cultivos frescos para la prueba de Inhibición de Crecimiento. Las cepas de micoplasmas obtenidas en el aislamiento se sembraron por partida doble en medio sólido de Frey y sobre la superficie del agar sembrado se colocó un disco de papel filtro Watmann del No.1 impregnado con suero hiperinmune contra *Mycoplasma gallisepticum* y asimismo un disco de papel filtro

impregnado con suero hiperinmune contra *Mycoplasma synoviae* el cual fué proporcionado por la Sección de Ciencias de la Salud Animal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Se emplearon como cepas de referencia la cepa de *Mycoplasma synoviae* WVU 1853 (ATCC) , como control negativo y la cepa de *Mycoplasma gallisepticum* A5969 (Atlanta), como control positivo. Se consideró aislamiento positivo al observar con ayuda del microscópio estereoscópico una zona de inhibición de crecimiento no menor de 5 mm alrededor del disco de papel filtro (ver fig. No. 2).

RESULTADOS.

Se observaron diversas intensidades de aglutinación. Se tomó como aglutinación positiva aquellos sueros que presentaban grumos de color azul. De las veinte muestras de suero 15 resultaron positivas a la prueba de Aglutinación en Placa.

De las 20 muestras pulmonares se obtuvieron 12 cultivos puros de micoplasmas. A partir de los doce cultivos puros se identificaron por medio de la prueba de Inhibición de Crecimiento, 4 como *Mycoplasma gallisepticum* y 3 como *Mycoplasma synoviae*. Como se muestra en el cuadro y gráfica No. 1

Cuadro No. 1.

No. de muestras	P.A.P		Aislamiento	Identificación M.g.	Identificación M.s.
	+	-			
20	15	5	12	4	3
%	75%	25%	60%	20%	15%

M.g. *Mycoplasma gallisepticum*.

M.s. *Mycoplasma synoviae*.

P.A.P. Prueba de aglutinación en placa.

(+). Positivo.

(-). Negativo.

impregnado con suero hiperinmune contra *Mycoplasma synoviae* el cual fué proporcionado por la Sección de Ciencias de la Salud Animal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Se emplearon como cepas de referencia la cepa de *Mycoplasma synoviae* WVU 1853 (ATCC) , como control negativo y la cepa de *Mycoplasma gallisepticum* A5969 (Atlanta), como control positivo. Se consideró aislamiento positivo al observar con ayuda del microscopio estereoscópico una zona de inhibición de crecimiento no menor de 5 mm alrededor del disco de papel filtro (ver fig. No. 2).

RESULTADOS.

Se observaron diversas intensidades de aglutinación. Se tomó como aglutinación positiva aquellos sueros que presentaban grumos de color azul. De las veinte muestras de suero 15 resultaron positivas a la prueba de Aglutinación en Placa.

De las 20 muestras pulmonares se obtuvieron 12 cultivos puros de micoplasmas. A partir de los doce cultivos puros se identificaron por medio de la prueba de Inhibición de Crecimiento, 4 como *Mycoplasma gallisepticum* y 3 como *Mycoplasma synoviae*. Como se muestra en el cuadro y gráfica No. 1

Cuadro No. 1.

No. de muestras	P.A.P		Aislamiento	Identificación M.g.	Identificación M.s.
	+	-			
20	15	5	12	4	3
%	75%	25%	60%	20%	15%

M.g. *Mycoplasma gallisepticum*.

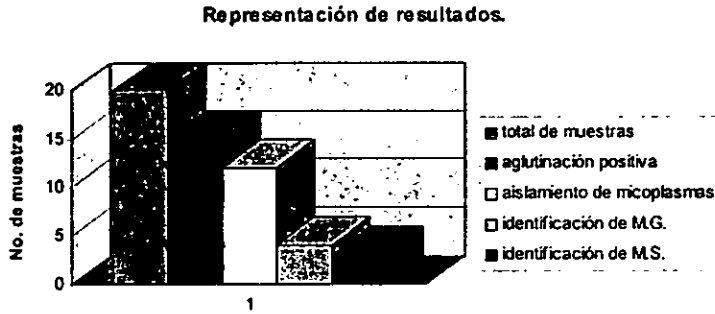
M.s. *Mycoplasma synoviae*.

P.A.P. Prueba de aglutinación en placa.

(+). Positivo.

(-). Negativo.

Gráfica No. 1

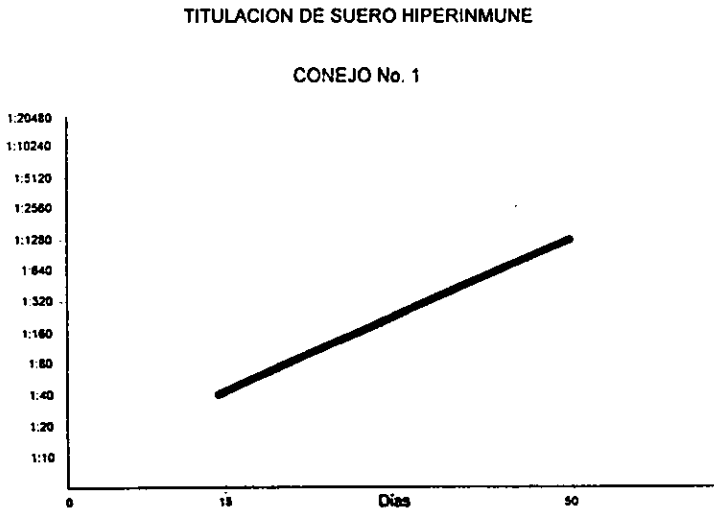


M.G. *Mycoplasma gallisepticum*.

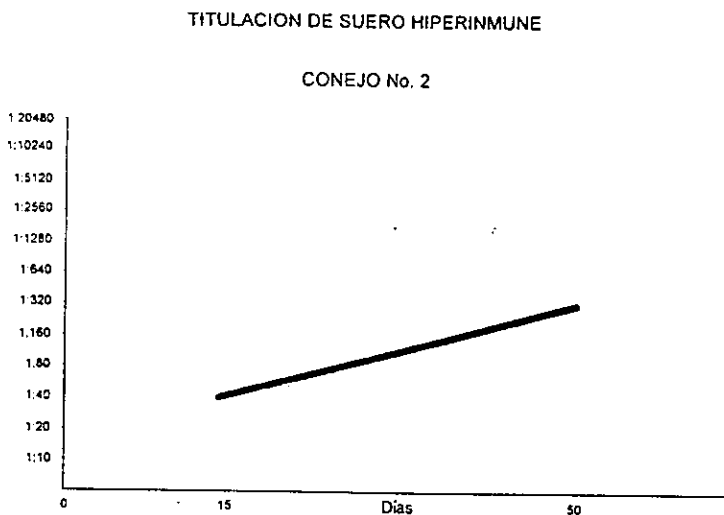
M.S. *Mycoplasma synoviae*.

Los títulos de anticuerpos obtenidos por medio de la técnica de Microaglutinación, mostraron después de la primera inoculación, tanto en el conejo No.1 como en el conejo No.2 título de 1:40 ; mientras que después de la última inoculación el conejo No.1 alcanzó título de 1:1280 y el conejo No.2 tuvo título de 1:320. (Gráfica 2 y 3)

Gráfica No.2



Gráfica No. 3.



DISCUSION Y CONCLUSION.

La micoplasmosis aviar es una enfermedad de las aves que suele confundirse por los signos clínicos con otras etiologías, por lo que es de mucha importancia el diagnóstico exacto para el control y prevención adecuados y este lo podemos realizar por medio del aislamiento e identificación del principal agente causante por medio de técnicas inmunológicas.(4).

En México es muy difícil el aislamiento e identificación de micoplasmas aviáres debido a que se carece de cepas de referencia y sueros hiperinmunes, las técnicas que por lo regular se utilizan son la prueba de la inhibición de la hemoaglutinación y ELISA, las cuales los reactivos son de importación .(7,10).

Si bien la prueba de aglutinación en placa no es muy específica, que influyen varios factores relacionados con la conservación de las muestras y que pueden dar resultado falsos positivos, o bien por la baja concentración de anticuerpos presentes que no fuesen capaces de dar una reacción aglutinante., si nos sirvió como base para deducir que estaban presentes micoplasmas en el proceso infeccioso en las aves, sobre todo por el

alto porcentaje de positividad obtenido en esta. (5,6,7,10).

Nos apoyamos en el cultivo para determinar la presencia de micoplasmas, observando en gran parte del total de las muestra pulmonares sembradas la presencia de colonias de forma características de "huevo estrellado".(1,3,4). Nos pudimos dar cuenta que es mucho más fácil el aislamiento primario que su conservación.

La prueba de inhibición de crecimiento, se basa en criterios de observación, crecimiento de micoplasmas abundante y especificidad del suero hiperinmune(8). El suero hiperinmune no se comparó con sueros de referencia debido a que no se pudieron conseguir. Se valoró la prueba de inhibición de crecimiento y la efectividad del suero hiperinmune producido al correrlo con las cepas de referencia de *Mycoplasma gallisepticum* A5969 y de *Mycoplasma synoviae* WVU 1853.

Se necesita obtener a partir de cepas de campo nuestras propias cepas de referencia, así como producir sueros hiperinmunes específicos con los cuales es posible realizar la prueba de inhibición de crecimiento.

No se relizaron las pruebas bioquímicas correspondientes tales como: fermentación de la glucosa, hidrolisis de la arginina y urea, actividad de la fosfatasa (3)., que hubieran sido necesarias para clasificar a los micoplasmas, debido a que se carecia de los reactivos para llevarlas a cabo.

El suero hiperinmune producido fue titulado por medio de la técnica de microaglutinación debido a que esta se puede realizar con material a nuestro alcance además de que es considerada de sensibilidad y especificidad adecuada comparado con la prueba de aglutinación en placa, aglutinación en tubo e inhibición de la hemoaglutinación esto en base a diversos estudios realizados anteriormente.(9).

En el caso del protocolo de inmunización utilizado, el conejo No. 1 alcanzó título de 1:1280, este título se consideró aceptable para la identificación de *Mycoplasma gallisepticum* (Frey et al, 1972), de tal manera que con esto se puede establecer este protocolo de inmunización y titulación para la obtención de sueros hiperinmunes de buena calidad y asimismo servir como suero de referencia y en la producción de conjugados para diagnóstico.El proceso de elaboración del medio de cultivo, aislamiento e identificación de micoplasmas es tedioso y tardado, se espera que a partir del presente trabajo se trate de implementar otras técnicas de diagnóstico más rápido.

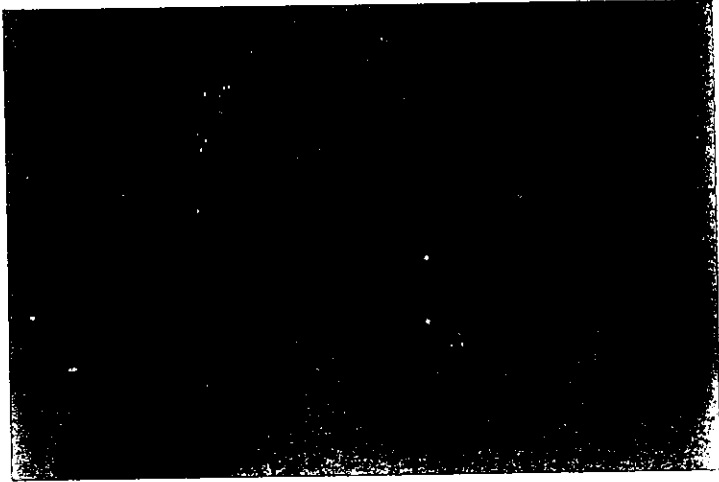


Fig. No. 1 Colonias de *Mycoplasmas* observadas en objetivo 4X, aisladas a partir de las muestras pulmonares de los pollos con afección respiratoria

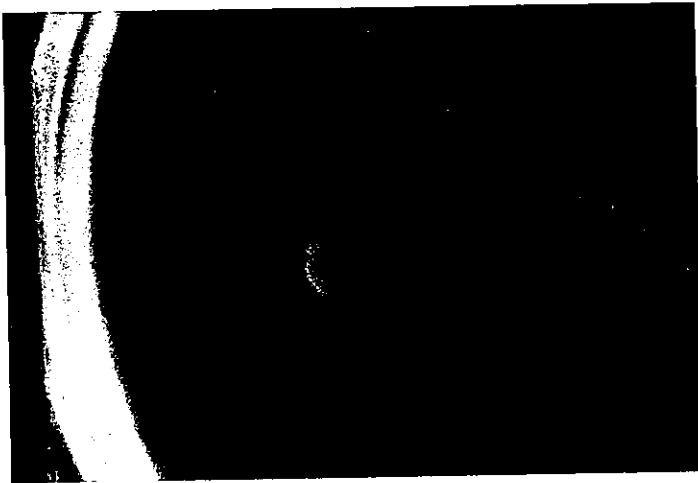


Fig. No. 2 Prueba de inhibición de crecimiento positiva. Se empleó cepa de referencia A5969 de *Mycoplasma Gallisepticum* y un disco impregnado con suero hiperinmune contra *Mycoplasma gallisepticum* de título 1:1280

BIBLIOGRAFIA.

1. Calnek, B. W. Diseases of Poultry. 10 th.(1997). Iowa State University Press. U.S.A. pp. 197-223.
2. Carter, Cole. Diagnostic procedures in Veterinary Bacteriology and Micology. 5 th. (1990). Copyright by Academic Press. USA. pp.333-341.
3. Howard, W., Cole. Mycoplasmosis in animals. Laboratory diagnosis. First edition.(1994). Commite of the American Asociation of Veterinary Diagnosis. Iowa State University Press. USA. pp. 3 - 34.
4. Kleven, S. H. Laboratory Techniques for Avian Mycoplasmas.(1983). University of Georgia. Departament of Avian Medicine. pp. 58-74.
5. Kleven, S. H. and Fletcher, O. J. *Mycoplasma gallisepticum* infection.(1983). Departament of Avian Medicine. University of Georgia. The American Association of Avian Pathologist. pp. 2-9.
6. Márquez-López, S. Aislamiento de micoplasmas a partir de sacos aereos de pollos de engorda con problemas respiratorios.(1984). Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México.
7. Ortiz, M.A. Control de micoplasmosis aviar.(1992). III Jornada Médico Avícola. Departamento de Producción Animal: Aves. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México. pp. 170-171.
8. Ortiz, M.A., and Yamamoto R. Departament of Epidemiology and Preventive Medicine.(1974). University of California.USA. pp. 1,9.
9. Ortiz, M. A. and Yamamoto, R. Microtiter Agglutination Test for *Mycoplasma meleagridis*. (1974). XV World's Poultry Congress. New Orleans. U.S.A. pp. 171.
10. Rodríguez, M.G. Estudio exploratorio de aglutininas contra *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* en aves productoras de carne y huevo de diferentes zonas avícolas de la República Mexicana. (1989). Tesis de licenciatura. Facultad de Mdicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México.