



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

28842.6

"MANUAL DE LABORATORIO PARA EL DIAGNOSTICO DE MICOPLASMAS AVIARES"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

ANA LAURA **L**FERNANDEZ MARTINEZ

ASESORES: M.V.Z. M. EN C. TONATIUH A. CRUZ SANCHEZ.
M.V.Z. ADRIANA GARULO FUENTES.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



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

UNIVERSIDAD NACIONAL
 AVENIDA DE
 MEXICO

U. N. A. M.
 DEPARTAMENTO DE ESTUDIOS
 ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DEPARTAMENTO DE
 EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
 P R E S E N T E

AT'N: Q. Ma. del Carmen García Mijares
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

" Manual de Laboratorio para el Diagnóstico de Micoplasmas
 Aviares "

que presenta la pasante: Ana Laura Fernández Martínez
 con número de cuenta: 8960175-8 para obtener el TITULO de:
Médica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE.
 "POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 28 de Enero de 199 9

PRESIDENTE	Dr. Ariel Ortíz Muñiz	
VOCAL	MVZ José Margarito Rojo López	
SECRETARIO	M. C. Tonatiuh A. Cruz Sánchez	
PRIMER SUPLENTE	MVZ Susana E. García Vázquez	
SEGUNDO SUPLENTE	MVZ Silviano Trejo Núñez	

AGRADECIMIENTOS

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Por permitirme ser integrante de esta máxima casa de estudios y lograr una carrera profesional

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUATITLAN

Por haberme abrigado en sus aulas, contribuir grandemente a mi formación profesional y por cada instante vivido en ti.

A LOS PROFESORES.

Con admiración y respeto a todos los profesores que brindan sus conocimientos y experiencias personales referentes a la profesión.

A LA SECCION DE MICROBIOLOGIA

Por el apoyo ofrecido para la elaboración de este trabajo.

A TODO EL JURADO

Por dedicarle parte de su tiempo a mi tesis

DEDICATORIA

A DIOS.

Por darme un tiempo y un espacio en este mundo, permitiéndome compartirlo con los seres que quiero y estimo.

A MIS PADRES

*José Luis Fernández Olmos.
Martha Martínez Fuentes.*

En especial a mi madre por todo lo que ha dado por mí, sacrificándose siempre para brindarme todo lo que en sus manos estuviera.

Con cariño y admiración.

A MIS ABUELITOS

Eligio y Luisa.

Por su cariño y sus consejos.

A MIS HERMANOS

Rafael y Teresa.

Por el apoyo siempre otorgado, porque de una u otra forma han contribuido para que logrará esta meta

A MIS FAMILIARES.

Por el apoyo incondicional en mi formación.

A MIS SOBRINOS.

Daniel y Marisol

Por que sus sonrisas son como una pequeña luz que ilumina a quienes los rodean.

A DANIEL.

Porque eres parte importante de mi vida.

AL MVZ ARTURO MARTINEZ FUENTES.

Un amigo que ha sido un apoyo y un ejemplo a seguir.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS.

Por el apoyo mostrado en cualquier momento, este es un logro que quiero compartir con
ustedes.

No menciono nombres, para no omitir alguno.

GRACIAS.

**DIOS BENDICE A LOS QUE PROGRESAN SIN
CAMBIAR SU ESENCIA.**

INDICE

I	Resumen.	1
II	Introducción.	2
III	Objetivos.	5
IV	Panorama de la micoplasmosis aviar.	6
V	Generalidades de los micoplasmas.	8
	1. Generalidades de <i>M. gallisepticum</i> y <i>M. synoviae</i> .	11
	2. Enfermedad crónica respiratoria.	12
	3. Sinovitis infecciosa.	17
VI	Diagnóstico avícola.	22
VII	Aislamiento e identificación de micoplasmas aviáres.	
	1. Toma de muestras.	24
	2. Medio de cultivo.	25
	3. Métodos de cultivo.	26
	4. Técnica de aislamiento	26
	5. Pruebas Bioquímicas de caracterización.	
	1.1. Prueba de digitonina.	29
	1.2. Prueba de fermentación de carbohidratos.	30
	1.3. Prueba de hidrólisis de la arginina.	30
	1.4. Prueba de hidrólisis de la urea.	31
	1.5. Prueba de actividad de la fosfatasa.	32
VIII	Pruebas inmunológicas para la identificación de micoplasmas.	
	1. Obtención de antisuero.	34
	2. Preparación de antígeno para inmunizar.	35
	3. Protocolo de inmunización.	35
	4. Microaglutinación en placa.	36
	5. Prueba de inhibición de crecimiento.	37
	6. Prueba de inhibición metabólica.	38
	7. Prueba de inhibición de la reducción del tetrazolio.	39
	8. Inmunofluorescencia.	40
	8.1. Inmunofluorescencia indirecta.	40
	8.1.1. Precipitación del suero para inmunofluorescencia indirecta	41
	8.1.2. Conjugación del suero con isotiocianato de fluoresceína.	42
IX	Pruebas serológicas para la identificación de micoplasmas.	

	1. Colección del suero.	45
	2. Aglutinación en placa.	46
	3. Inhibición de la hemoaglutinación.	48
	3.1. Título de hemoaglutinación del antígeno.	49
	3.1.1. Técnica de dilución del suero.	49
	3.1.2. Técnica de dilución del antígeno.	50
	4. Preparación de glóbulos rojos al 0.5 % en PBS.	52
	5. Preparación de antígenos..	53
	6. Antígeno para aglutinación en placa.	53
	7. Antígeno para inhibición de la hemoaglutinación.	54
	Análisis de la Enzima Ligada a un Inmunoabsorbente Inerte (ELISA).	54
X	Diagnóstico molecular.	
	1. Reacción de la Cadena de la Polimerasa. (PCR).	58
XI	Conclusión.	63
XII	Apéndice	64
XIII	Glosario	66
XIV	Bibliografía.	67

Este trabajo se realizó en el Laboratorio L-513 de la Sección de Microbiología del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y forma parte de los trabajos de la Cátedra de Investigación: ***Producción de antígenos y antisueros para diagnóstico.***

RESUMEN.

El presente trabajo brinda al estudiante de Medicina Veterinaria, una fuente de información condensada que abarca los aspectos clínicos (etiología, epizootiología, signos clínicos, lesiones, inmunidad, diagnóstico, tratamiento, prevención y control) de los dos principales micoplasmas patógenos (*Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae*) que afectan a la avicultura

Presenta en forma ordenada el desarrollo de las pruebas de laboratorio utilizadas más comúnmente para el aislamiento e identificación de los micoplasmas aviarios, así como su interpretación, ventajas y desventajas.

Es el resultado de la recopilación bibliográfica de libros, memorias y revistas especializadas en el tema.

INTRODUCCION

Actualmente la avicultura mexicana se encuentra ante una serie de retos y cambios muy dinámicos. Se caracteriza principalmente por la búsqueda del mejoramiento productivo que le permita mantener un nivel altamente competitivo dentro del marco de globalización que se ha desarrollado en los últimos años. Sin embargo, en esta industria se presenta una serie de riesgos que afecta la producción, como es la presencia de diversos gérmenes patógenos que causan enfermedades dentro de éstos se encuentran los micoplasmas.

La micoplasmosis ha sido uno de los más importantes problemas de salud que afecta la industria avícola desde hace décadas. Los micoplasmas son bacterias, que de acuerdo a la especie pueden colonizar el tracto respiratorio, el tracto reproductivo y las articulaciones de las aves. Dos especies *Mycoplasma gallisepticum* (MG) y *Mycoplasma synoviae* (MS) son los micoplasmas patógenos predominantes en los pollos. *M. synoviae* puede causar enfermedad respiratoria o de las articulaciones o ambas en muchos casos y *M. gallisepticum* primariamente ocasiona una enfermedad respiratoria (18).

La denominación de micoplasma aplicada a estos microorganismos obedece a las formas de crecimiento a manera de micelio observadas en ocasiones y a la plasticidad propia de su marcado pleomorfismo debido a la falta de pared celular, por lo que son muy susceptibles al calor, el frío, la deshidratación y los desinfectantes. Como resultado de esto los micoplasmas sobreviven pobremente fuera del huésped. En un ambiente seco y cálido pueden sobrevivir unas cuantas horas fuera del ave, sin embargo, en un ambiente húmedo y fresco, el periodo de sobrevivencia puede extenderse hasta unos cuantos días. Las cepas de estos micoplasmas varían en virulencia, estructura antigénica y tropismo por los tejidos. Las hay de muy virulentas hasta avirulentas, en términos generales, resulta difícil diagnosticar la presencia de cepas avirulentas, pues su respuesta de anticuerpos suele ser baja y también en el número de microorganismos. MS y MG ocasionan hemoaglutinación de eritrocitos de pollo o de pavo.(18,23).

La fuente más importante de infecciones es a través del huevo. Si hablamos de la transmisión entre parvadas, la mayor fuente de infección es de tipo mecánico, lo que significa que los microorganismos son transportados de parvada a parvada por seres humanos, equipo o animales. La transmisión por aerosol es posible pero en general sólo ocurre a unos cuantos metros de distancia. Los portadores biológicos de estos micoplasmas son principalmente los pollos y los pavos. Otras especies avícolas deben ser consideradas susceptibles, aun cuando la mayoría son relativamente resistentes a la infección, independientemente de ello todas las especies avícolas deben ser consideradas como portadores potenciales(18,23).

Los países cuya industria avícola está subdesarrollada o existen grandes poblaciones avícolas con parvadas infectadas, la micoplasmosis es un problema muy común. Esto es especialmente cierto en áreas donde es frecuente la existencia de edades múltiples en la misma granja. Las parvadas infectadas lo estarán de por vida y pueden ser aislados de las tráqueas de aves clínicamente normales. Estas aves son portadoras

crónicas y actúan como fuente de micoplasma para otras parvadas. El número de microorganismos presentes es mayor durante la fase aguda de la infección(18,23).

La infección por *M. synoviae* se presenta con más frecuencia como una infección subclínica de aparato respiratorio superior. Puede provocar infección en sacos aéreos cuando se combina con enfermedad de newcastle, bronquitis infecciosa, o ambas. En otras ocasiones se hace sistémica y produce sinovitis infecciosa, una enfermedad crónica infecciosa en pollos y pavos, que involucra de manera primaria las membranas sinoviales de las articulaciones y cubiertas tendinosas, produciendo una sinovitis exudativa, tenovaginitis o bursitis.(6,9,48).

La infección por *M. gallisepticum* se conoce como enfermedad respiratoria crónica (ERC) en pollos y como sinusitis infecciosa en pavos. Se caracteriza por estertores respiratorios, tos, secreciones nasales y a menudo sinusitis en pavos. Las manifestaciones clínicas, por lo general, se desarrollan con lentitud y la enfermedad tiene un curso prolongado. La infección de los sacos aéreos se define como aerosaculitis, que es el resultado de la infección por este micoplasma complicado con algunas infecciones respiratorias virales y por lo común, con *E. coli*. Estas dos enfermedades bacterianas interrelacionadas en muchas ocasiones, constituyen la patología que más costos económicos representa en pollos de engorda.(6,9,26,33,48).

Casi todas estas pérdidas se relacionan de manera directa o indirecta con infección por *M.gallisepticum*, con o sin factores complicantes. Las pérdidas económicas, baja calificación a las canales, reducción en la conversión de alimento y en la eficacia de la producción de huevo, y mayores costos en la medicación son factores adicionales que le hacen una de las enfermedades más costosas a las que se enfrenta la industria avícola.(6).

El diagnóstico de la micoplasmosis en parvadas comerciales es todavía un esfuerzo desafiante. Para diagnosticarla es necesario combinar la historia del lote, los signos clínicos de la enfermedad, la identificación del agente y las pruebas serológicas.

En muchos casos el descubrimiento de anticuerpos específicos en el suero es mucho más práctico que la identificación del propio agente. Se han desarrollado muchas técnicas para detectar anticuerpos dirigidos contra MG y MS como la prueba de aglutinación en placa, inhibición de la hemoaglutinación y ELISA (26).

Para el aislamiento e identificación de estos microorganismos, se utilizan hisopos estériles para tomar muestras de senos, tráquea, sacos aéreos o articulaciones y se siembran en medios específicos como caldo de Frey's y de ahí al mismo medio de agar, cuando se observa el crecimiento de las colonias características, estas deben ser identificadas por medio de las pruebas de inmunofluorescencia, inhibición de crecimiento ó inhibición metabólica con antiseros específicos.

La innovación más reciente en diagnóstico de micoplasmas incluye el uso combinado de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y sondas de DNA para la detección directa de micoplasmas a partir de hisopos traqueales. Este proceso implica la ampliación enzimática de DNA del micoplasma directamente del hisopo. El kit ha sido bien probado en el campo y es tan sensible como los métodos de cultivo convencionales y tiene la ventaja de ser más rápida. El kit de PCR para el diagnóstico de micoplasma es la

prueba ideal para México por el problema de obtener todos los reactivos necesarios para el cultivo convencional y los métodos de identificación. A las 48 horas de recibir la muestra, el laboratorio sería capaz de afirmar decisivamente si una parvada está o no infectada.(18).

Los antibióticos más comúnmente utilizados en el tratamiento solo interrumpen momentáneamente la infección, cuando dejan de suministrarse inicia nuevamente la reproducción bacteriana y el problema continúa. Por lo anterior se recomiendan entonces, tomar medidas de bioseguridad y de control.

La necesidad de realizar el diagnóstico de la micoplasmosis en el país nace de la alta incidencia de los problemas que producen en las aves, sin embargo existen pocos lugares donde se lleva a cabo, esto es por la falta de conocimiento de las técnicas y métodos existentes así como la falta de recursos humanos capacitados. Debido a esto se ha considerado la elaboración del presente manual tratando de reunir los métodos de diagnóstico más comúnmente utilizados.

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL

Elaborar un manual sobre las pruebas de laboratorio más utilizadas para el diagnóstico de micoplasmosis aviar que sirva como apoyo de estudio en Medicina Veterinaria

OBJETIVO PARTICULAR.

Describir cada una de las pruebas que se llevan a cabo para el aislamiento e identificación de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae*, así como su interpretación.

PANORAMA DE LA MICOPLASMOSIS AVIAR EN MEXICO.

Entre las enfermedades infecciosas que causan mayores pérdidas económicas, definitivamente la enfermedad crónica respiratoria complicada (ERCC) sigue siendo la causa principal.(2).

La información que hasta hoy se ha generado al respecto es escasa y fragmentada, por lo cual únicamente nos servirá para darnos una idea de la situación de los problemas respiratorios y la información deberá tomarse con reserva..(50).

En 1972, López Coello, C., realiza un trabajo estadístico sobre los casos presentados en el Departamento de Producción Avícola (DPA): La colibacilosis es la enfermedad que se diagnostica con mayor frecuencia, seguida por aerosaculitis (As.), newcastle (ENC), enfermedad crónica respiratoria (ERC) y coriza infecciosa (CI). La combinación colibacilosis con aerosaculitis y enfermedad crónica respiratoria suma 36% de los diagnósticos y la combinación de newcastle, bronquitis infecciosa y laringotraqueítis suma el 11 %

En 1977, Charles, L. M. continúa el trabajo de López Coello, analizando los resultados de 1972 a 1975: La combinación Colibacilosis y enfermedad crónica respiratoria suma el 33.3 % de los casos positivos y la combinación de newcastle, bronquitis infecciosa y laringotraqueítis suma el 10%.

En 1982, García Limón, A. presenta un trabajo en el cual pone en manifiesto los principales problemas respiratorios en el estado de Jalisco, siendo estos la colibacilosis, enfermedad crónica respiratoria complicada y la encefalomielitís.

En 1983, Mireles, V. hace hincapié en los graves problemas que se observan a nivel nacional en la infección por micoplasmas, así como un análisis de sus repercusiones.

En 1984, Mosqueda, A., resumiendo la información de diagnóstico del DPA, para el periodo de 1981-1983 encontró: Colibacilosis con la enfermedad crónica respiratoria, como promedio de los 3 años, suma un 32.8 %, mientras que la combinación de newcastle, bronquitis infecciosa y laringotraqueítis suman un 8.6 % de los diagnósticos emitidos.

En 1987 Antillón, A. continúa los trabajos anteriores, resumiendo información de 1984 y 1985, basada en un total de 3500 casos recibidos: Colibacilosis con la enfermedad crónica respiratoria, suman un 48.2 %, mientras que newcastle, bronquitis infecciosa y laringotraqueítis, dan como resultado un 32.2 %

En 1988 Senties, G. presenta el último trabajo de esta serie por parte de la UNAM, analizando los años 1986 y 1987, basada un total de 4578 casos recibidos encontrando que enfermedad crónica respiratoria se complica con *E coli*, realizándose el diagnóstico como enfermedad respiratoria crónica complicada (ERCC), la cual promedia un 21.1 %, mientras que la suma de newcastle, bronquitis infecciosa y laringotraqueítis promedia un 6.9 %.

En la década de los 90's, se observa una nueva signología en la presentación de las enfermedades respiratorias, viéndose frecuentemente cabezas hinchadas; así como también brotes de colibacilosis y enfermedad crónica respiratoria complicada que no ceden a los tratamientos usualmente utilizados.

Se presenta el siguiente censo avícola nacional para que el lector pueda sacar valores más reales de las repercusiones económicas de la micoplasmosis.

CENSO AVICOLA

Parvada Nacional Avícola 1996

Fin zootécnico	Número de aves
Ponedoras en producción	85438260
Ponedoras en crianza	21359565
Reproductoras ligeras en producción	582555
Reproductoras ligeras en crianza	319624
Reproductoras pesadas en producción	5334000
Reproductoras pesadas en crianza	3543000
Progenitoras ligeras en producción	4683
Progenitoras ligeras en crianza	2755
Progenitoras pesadas en producción	130640
Progenitoras pesadas en crianza	98130
Pollo de engorda	166200000
Guajolote al ciclo	700000
TOTAL	283713212

Fuente: Unión Nacional de Avicultores

Avilés B. P. La avicultura Mexicana en cifras. Tecnología Avipecuaria, No 117 1997

GENERALIDADES DE LOS MICOPLASMAS.

Los micoplasmas son miembros de la clase Mollicutes, familia Mycoplasmataceae, son los más pequeños procariotes de vida libre con 0.3 a 0.8 micras de diámetro y pasan por filtros cuyo tamaño de poro es de 450 nm (22,47). Se caracterizan por carecer de la habilidad genética para formar una pared celular, que hacen a éstas células plásticas, fácilmente deformables y fáciles de dañar. (3,22,52).

Los micoplasmas son extremadamente pleomórficos y pueden aparecer en forma de cocos, filamentos, espirilos, anillos, glóbulos y gránulos (7,13,22). De la producción de forma filamentosas con respecto de hongos deriva el nombre de Mycoplasma (mices: hongo y plasma: una forma).(31).

El primer miembro de este grupo que se describió fue el agente de la pleuropneumonía bovina, y como resultado los micoplasmas se designaron durante largo tiempo como el grupo PPLO (7,52).

Son gram negativos, pero no es posible estudiarlos por los métodos bacteriológicos ordinarios, a causa del tamaño de sus colonias y la delicadeza de sus células individuales y su coloración pobre con colorantes de anilina, prefiriéndose utilizar la tinción de Giemsa (7,13,22).

La estructura celular de los micoplasmas tiene una configuración muy simple; tienen solo tres organelos: membrana celular, ribosomas y el genoma. Aparentemente el citoplasma no contiene organelos membranosos, aún están presentes algunos ribosomas bajo la forma de gránulos citoplasmáticos; también se encuentra RNAm, RNAt y un DNA circular de doble filamento como cromosoma. La membrana más externa es una membrana citoplásmica trilaminar, constituida por proteínas, glicoproteínas, glicolípidos, fosfolípidos, y esteroides que le brinda protección y estabilidad (24). Los micoplasmas que poseen esteroides en sus membranas no los sintetizan por sí mismos, sino que los necesitan preformados en el medio de cultivo. Este requerimiento de esteroides es una base para separar algunos microorganismos sin pared celular en dos géneros, Mycoplasma, que requieren esteroles, y Acholeplasma, que no lo necesitan. Los miembros de un tercer género, Thermoplasma, tampoco requieren esteroides pero se distinguen de Acholeplasma por el hecho de que son termófilos (25,52).

El metabolismo energético de los micoplasmas no es único. Algunas especies son oxidativas, poseen el sistema citocromo y producen ATP por fosforilación oxidativa. Otras especies se parecen a las bacterias del ácido láctico por ser estrictamente fermentativas, y producen energía por fosforilación a nivel del sustrato, produciendo ácido láctico como producto final de la fermentación del azúcar.(25).

Algunos micoplasmas poseen además estructuras celulares especiales, responsables de la adhesión, así como capas superficiales que pueden considerarse como material constitutivo de una cápsula.

Los micoplasmas no tienen flagelos, pero se puede apreciar movilidad en pocas especies. El mecanismo de este movimiento es incierto, pero se requiere su adherencia a superficies, y se ha sugerido que el mecanismo subyacente consiste en la liberación y fijación alternada de la célula a la superficie, posiblemente a la estructura terminal ya señalada.

El mecanismo por el cual se reproducen, sometido mucho tiempo a controversia, se sabe ahora que es por fisión binaria. (52).

Las colonias de los micoplasmas sobre medios sólidos tienen una estructura característica de huevo frito, que consiste en un área opaca central parcialmente

incrustada en el sustrato y una periferia translúcida (49). El crecimiento de micoplasmas no es inhibido por la penicilina, u otros antibióticos que inhiben las síntesis de pared celular, pero son tan sensibles como las otras bacterias a los antibióticos que actúan sobre estructuras distintas de la pared celular. (49,56).

Los micoplasmas son resistentes al acetato de talio a concentración 1:10000, y se pueden usar para inhibir a las demás bacterias. (22).

Tanto los requerimientos de proteínas como ácidos grasos pueden suplirse con suero, y por ello, los medios para el cultivo se suplementan comúnmente con un 20 % de suero de caballo y con derivados de levadura para proporcionarles el dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD).(52).

La vía de entrada natural de estos microorganismos es por tracto respiratorio, conjuntiva o genital. Al penetrar por vía respiratoria se localiza en tracto superior y sacos aéreos, la colonización ocurre por medio de una proteína ligante de la membrana del micoplasma uniéndose a una glicoproteína siálica del epitelio traqueobronquial, una vez colonizado el epitelio se produce una ciliostasis debida a la producción de peróxidos de hidrógeno que inactiva a la enzima epitelial catalasa, permitiendo que el peróxido de hidrógeno actúe sobre las membranas celulares. Por otro lado si el micoplasma alcanza la circulación sanguínea pasa a serosas de articulaciones, manifestando una artritis y a mucosas del aparato reproductor.(15).

En la actualidad se reconocen 20 especies de micoplasmas en medicina aviar y 66 especies en patología animal y humana. (15,31).

Se han aislado acholeplasmas como es el caso de *Acholeplasma laidlawii*; así mismo se ha aislado y tipificado el *Ureaplasma gallorale* de pollos y un *Ureaplasma* spp. de pavos. (31).

MICOPLASMAS AISLADOS EN AVES DOMESTICAS.

A. laidlawii
M. anatis
M. anseris
M. cloacale
M. columbinasale.
M. columbinum.
M. columborale.
M. gallinaceum.
M. gallinarum.
M. gallisepticum.
M. gallopavonis.
M. glycyphilum.
M. iners.
M. iowae.
M. lipofaciens.
M. meleagridis.
A. axanthum *M. pullorum.*
M. synoviae.
Ureaplasma gallorale
Ureaplasma sp.

Howard. 1994

TAXONOMIA DE LOS MICOPLASMAS**CLASE MOLLICUTES.**

Orden I Mycoplasmatales.
Familia i Mycoplasmataceae.
Genero I Mycoplasma

Genero II Ureoplasmas

Familia II Spiroplasmataceae
Genero I Spiroplasma.

Orden II Acholeplasmatales
Familia I Acholeplasmataceae .
Genero I Acholeplasma

Orden III Aeroplasmatales
Familia Anaeroplasmataceae
Genero I Anaeroplasma.

Genero II Asteroleplasma

Balows 1992

CARACTERISTICAS GENERALES DE *M. gallisepticum* Y *M. synoviae*.

Comparativamente podemos diferenciar a los dos principales micoplasmas patógenos de las aves por las siguientes características: a diferencia de MG, MS no tiene variantes antigénicas, pero si presenta cepas con diferencias en su patogenicidad o transmisibilidad. MS es mucho más invasiva que MG, aunque la capacidad de MS de reducir la postura y los nacimientos es menor que la producida por MG. (51).

Características distintivas de *Mycoplasma gallisepticum*:

Mycoplasma gallisepticum (MG) generalmente es de forma cocoide y su diámetro aproximado es de 0.25-0.50 milimicras (43,47). Tiene una estructura de fijación de naturaleza proteica con una localización terminal en forma de prominencia.

De MG se distinguen varias cepas: A5969, S6, F, y R (1,44). La cepa S6 de Zander se aisló del cerebro del un pavo con sinusitis infecciosa. La cepa A5969 llegó a ser una cepa estándar para producción de antígeno. La cepa F, que, por lo general, se utiliza en programas de vacunación con cultivos puros, es una cepa relativamente benigna, aunque el aislamiento de la cepa F original lo describieron Yamamoto y Adler, como una cepa patógena típica. La cepa R se aisló de aves con aerosaculitis y se emplea mucho para producción de bacterina y como cepa patógena en estudios de desafío.(6).

Fermenta glucosa, con producción de ácido pero no de gas, no hidroliza arginina, es fosfatasa negativa, reduce el tetrazolium, ocasiona hemólisis completa de eritrocitos de caballo incorporados al medio en agar y aglutina eritrocitos de pollo y de pavo.(6).

Características distintivas de *Mycoplasma synoviae*:

De MS se conoce una sola cepa 1853 WVU, pero puede presentar variantes en cuanto a su patogenicidad y a su tropismo tisular, por ejemplo algunas cepas de MS tienden afectar articulaciones, mientras que otras producen enfermedades respiratorias. (23).

Fermenta la glucosa, con producción de ácido pero sin gas en medio enriquecido, es fosfatasa negativo, tiene habilidad limitada para reducir las sales de tetrazolium y aglutina eritrocitos de pollo, pavo, hámster y conejillo de india.(6).

Tiene requerimientos especiales para el crecimiento en medios artificiales, tales como NAD, pero puede ser posible utilizar la nicotinamida en lugar del NAD para la producción de antígenos y para el cultivo se prefiere utilizar suero de cerdo.(6).

ENFERMEDAD RESPIRATORIA CRONICA.

La infección por *Mycoplasma gallisepticum* se conoce como enfermedad respiratoria crónica (ECR) Y como sinusitis infecciosa en pavos (6,29).

SINONIMIAS.

Catarro crónico
Enfermedad respiratoria crónica complicada.
Infección de los sacos aéreos (aerosaculitis).

ETIOLOGIA.

Mycoplasma gallisepticum es una especie patógena dentro del género *Mycoplasma* de la familia *Mycoplasmataceae* (6,48).

EPIZOOTIOLOGIA

La infección por *M. gallisepticum* se presenta de manera natural en pollos y pavos. No obstante también se puede aislar de infecciones naturales en faisanes, perdices chukar, pavo real, codorniz cola blanca, codorniz japonesa, faisán dorado, perico del Amazonas de nuca amarilla, patos, gansos y pavos salvajes (6).

TRANSMISION.

La fuente más común de transmisión entre parvadas es de tipo mecánico. En la mayor parte de los casos la mayor fuente de difusión es el humano, los materiales o el equipo que el transporta. Las aves de vuelo libre presentan también un riesgo potencial, principalmente como portadores mecánicos y los roedores y otros mamíferos pueden jugar un papel importante (23). Las aves infectadas se convierten en portadores crónicos y actúan como fuente de infección para otras parvadas. Esto es muy importante en granjas con edades múltiples ya que las parvadas viejas actúan como reservorios de micoplasma para las nuevas parvadas, siendo imposible eliminar la infección a menos que se despoble, limpie y desinfecte toda la granja (18,23).

PERIODO DE INCUBACION.

El periodo de incubación puede variar de 6 a 21 días en la transmisión experimental pero la difusión de ave a ave dentro de una misma caseta es generalmente bastante rápida. Los pavos inoculados experimentalmente, muchas veces desarrollan sinusitis en 6 a 10 días. En condiciones naturales es muy difícil determinar la fecha exacta de exposición; porque parece que influyen muchas variables en el inicio y extensión de la infección clínica como para poder establecer períodos de incubación significativos (6).

SIGNOS CLÍNICOS.

POLLOS. Los signos clínicos más comunes están asociados con un problema del aparato respiratorio e incluye exudado nasal, estomudo, estertores traqueobronquiales, respiración con el pico semiabierto y sacuden con frecuencia la cabeza. En la forma encefálica de MG se presenta torticollis y opistótonos (10). El consumo de alimento se reduce y las aves pierden peso. En parvadas de postura, la producción de huevo disminuye. Sin embargo las parvadas pueden presentar evidencia serológica de infección sin signos clínicos evidentes, en especial si se encuentra la infección en edad joven y hay recuperación parcial. En parvadas de engorda casi todos los brotes se presentan entre las semanas 4 y 8 de edad. Los signos, por lo general, son más marcados que los observados en parvadas adultas (6).

Sin complicaciones la enfermedad puede ser inaparente o muy ligera, la gravedad del problema puede estar influenciada, además de las infecciones concomitantes por otros patógenos, por factores de manejo o debilitantes entre los cuales podemos incluir exceso de amoníaco o polvo en la atmósfera, hacinamiento, vacunaciones, cortes de pico, deficiencias nutricionales, etc. Parece existir un aumento de resistencia ligado con la edad del ave (las aves jóvenes son más susceptibles).(6).

PAVOS. Muchas veces, una secreción nasal con secreción espumosa ocular precede a la inflamación más típica de senos paranasales, puede haber cierre parcial o completo de los ojos por la grave inflamación de los senos, el apetito permanece casi normal tanto tiempo como el ave pueda ver para comer y conforme la enfermedad progresa, las aves se adelgazan. Los estertores traqueales, la tos y la respiración con dificultad se hacen evidentes si se presenta traqueitis o aerosaculitis. En parvadas reproductoras puede haber una baja en la producción o por lo menos disminución en la eficiencia reproductiva (6).

MORBILIDAD Y MORTALIDAD.

La infección por lo general afecta a todas las aves en una parvada, pero es variable en gravedad y duración. Tiende a ser más grave y de mayor duración en los meses fríos y afecta más a las aves jóvenes de manera más severa que a las más maduras, aunque puede haber una pérdida considerable por la menor producción de huevo.

Mientras se considera a MG como la primera causa de enfermedad respiratoria crónica, muchas veces otros microorganismos originan las complicaciones. La enfermedad de newcastle o bronquitis infecciosa pueden precipitar brotes por MG y *E. coli* es el microorganismo más frecuente en complicaciones con aerosaculitis. Se ha observado que *E. coli* no puede infectar los sacos aéreos a menos que los invada antes MG, solo o en combinación con el virus de newcastle o Bronquitis infecciosa (6).

La mortalidad por lo general, no es importante en parvadas adultas, pero puede haber reducción en la producción en cierto número de aves. En aves de engorda, la mortalidad puede ser baja en enfermedades sin complicaciones, hasta el 30% en brotes complicados, en especial durante los meses más fríos.(6).

PAVOS. La enfermedad afecta a la mayoría de los pavos en una parvada, aunque algunos no muestren sinusitis, y la forma de infección en el aparato respiratorio inferior puede ser más notable. La infección puede durar semanas o hasta meses en parvadas sin tratamiento. (6).

LESIONES MACROSCOPICAS

Consiste de manera primaria de exudado catarral en pasajes nasales, paranasales, tráquea, bronquios y en sacos aéreos puede presentarse exudado caseoso. La sinusitis, por lo general, es más grave en pavos, pero también lo padecen pollos y otros huéspedes aviares afectados. Se puede hallar cierto grado de neumonía, perihepatitis fibrinosa o fibrinopurulenta y pericarditis. (1,6).

HISTOPATOLOGIA.

Se observa hiperplasia epitelial, infiltración mononuclear de la lámina propia así como agregados foliculares (11). En los pulmones se encuentran áreas neumónicas y cambios linfocitulares, y lesiones granulomatosas. (6).

En la forma nerviosa de la enfermedad se observa encefalitis de moderada a severa, vasculitis, necrosis focal y meningitis.(10).

INMUNIDAD.

Las aves que se recuperan de los signos clínicos de la enfermedad tienen cierto grado de inmunidad. Tales parvadas sin embargo, portan el microorganismo y pueden transmitir la enfermedad a parvadas susceptibles por contacto o por transmisión en huevo a su prole. (6).

DIAGNOSTICO.

El diagnóstico clínico presuntivo de la infección por MG en las aves se basa en la historia clínica, signos clínicos y en los problemas de producción. (17).

El método serológico más utilizado consiste en la evaluación de las parvadas mediante la prueba de aglutinación en placa. Una vez detectada las aves rectoras, se requiere de la aplicación de algún método de confirmación, que suele ser la prueba de inhibición de la hemoaglutinación. La prueba de ELISA es cada vez más popular y puede eventualmente, remplazar a los procedimientos de aglutinación y/o HI. Cuando sea posible el aislamiento y la identificación de MG proporciona un diagnóstico definitivo.(23).

Las suspensiones de exudado traqueal y de sacos aéreos, cometas, pulmones o líquido de los senos se puede cultivar de manera directa en medios de Frey's. Los cultivos se deben ser incubados por lo menos de 5-7 días a 37°. (6).

DIAGNOSTICO DIFERENCIAL.

POLLOS. Se debe tener cuidado para diferenciar MG de otras enfermedades respiratorias comunes en pollos como: newcastle, bronquitis infecciosa, coriza infecciosa y cólera aviar. La infección de MG puede presentarse sola o con MS (6,17).

Es importante remarcar que los problemas de producción de huevo no solo se pueden deber a una causa en particular, sino que deben ser descartados diferentes enfermedades: Salmonelosis, encefalomiелitis aviar, bronquitis infecciosa, enfermedad de newcastle, síndrome de la baja postura y sinovitis infecciosa; así como manejo deficiente de las aves y problemas nutricionales.(46).

PAVOS. La presencia de una enfermedad respiratoria que incluye sinusitis en una parvada de pavos puede, algunas veces deberse a: omítosis, infección por MS o deficiencia de vitamina A.(6).

TRATAMIENTO.

MG es sensible a ciertos antibióticos: estreptomina, oxitetraciclinas, clortetraciclina, eritromicina, magnamicina, espiramicina, tilosina, tiamulina, lincomicina y espectomicina. Sin embargo, algunas cepas de MG se mencionan como resistentes a la estreptomina, eritromicina, espiramicina y tilosina. (6).

El uso de antibióticos en pollos de engorda reduce la severidad del brote respiratorio y velocidad de difusión de la infección en la parvada, también frecuentemente se usa en ponedoras y reproductoras para disminuir las pérdidas en la producción de huevo, pero estos no eliminan generalmente la infección de las aves o del huevo fértil. (39).

Sin embargo resultados recientes mencionan la posibilidad de eliminar la infección de los huevos incubables y consecuentemente de la progenie, mediante el tratamiento de las reproductoras con una quinolona (Baytril). (38,39,40).

En un trabajo experimental se demostró que la danofloxacina (fluoroquinolona nueva) a razón de 50 ppm en comparación con la tilosina a razón de 500 ppm fue superior su eficacia reduciendo la mortalidad, manteniendo la ganancia de peso, reduciendo la prevalencia de lesiones en los sacos aéreos, los aislamientos de MG y la seroconversión. (19,34,41).

PREVENCIÓN Y CONTROL.

Conservar parvadas de pollos y pavos libres de infección de MG solo es posible por la obtención de parvadas de reemplazo conocidas como libres de la infección y criándolas en estricto aislamiento para evitar la entrada de la enfermedad. El establecimiento y control del estado libre de MG en parvadas reproductoras se puede hacer, mediante la participación de programas de medicación, vacunación y medidas de bioseguridad.(6).

La situación más común bajo la cual se debe considerar la vacunación es cuando las aves son mantenidas bajo condiciones de edades múltiples. Existen dos tipos generales de productos biológicos a base de MG: Las bacterinas inactivadas emulsificadas en aceite y las vacunas vivas. (23).

De manera inherente las bacterinas son más seguras debido a que no introducen microorganismos vivos, pero son más costosas y no previenen la enfermedad, de modo que los pollos se infectarán si son desafiados, pero los signos clínicos serán mínimos. (18,23,43).

Dos dosis de bacterina confieren muy buena protección contra las pérdidas en la producción de huevo, disminuye la transmisión vertical, hay una reducción drástica en el uso de antibióticos y mejora la conversión alimenticia.(18,43)

Las aplicaciones deben hacerse con un intervalo de por lo menos 4 semanas entre ellas y se recomienda vacunar antes de la madurez sexual en pollitas de reemplazo, para permitir que ocurra una respuesta inmunológica óptima. (17).

La bacterina contra micoplasma pueden causar inflamación en el sitio de la inoculación (cuello), rigidez e inflamación de la cabeza y no impide la infección de la tráquea, pero reduce al mínimo las lesiones traqueales, previniendo así la diseminación de la infección. No bacterinizar parvadas libres de micoplasma. (17).

El otro tipo de vacunas comercialmente disponible son las vacunas vivas. La más utilizada es la cepa F que se ha usado así mismo bajo circunstancias limitadas, como vacuna para pollonas reproductoras pesadas, destinada a granjas infectadas con *M. gallisepticum* y a resultado ser sumamente efectiva en la prevención de pérdidas de la postura pero es, hasta cierto grado patógena, existiendo el riesgo de transmisión a los

pavos o aves reproductoras, a partir de las pollonas vacunadas. Asimismo, parece ser demasiado virulentas como vacuna en pollos de engorda. (24,41,43).

La cepa F vacunal es más barata de producir y se puede aplicar por vía ocular o puede ser aplicada por aerosol en gota grande lo cual ahorra cierto costo en la mano de obra.(18)

Recientemente se han introducido dos cepas adicionales de *M. gallisepticum* que se utilizan como vacunas vivas. La cepa TS-11, desarrollada por Whitehead, se ha utilizado en Australia durante muchos años y actualmente se encuentra en fase de desarrollo en los Estados Unidos. La cepa 6/85 que confiere protección significativa contra el desarrollo de aerosaculitis y disminuye las pérdidas de producción de huevo aproximadamente igual que la cepa F.(18) Ambas cepas son apatógenas, generan una débil respuesta de anticuerpos y se difunde muy poco. Estas características pueden representar ventajas distintivas desde el punto de vista de que son más seguras que la cepa F cuando se aplican a aves cercanas a otras parvadas. También, debido a que no son virulentas, probablemente tengan el potencial de ser utilizados en pollo de engorda de un día de edad. (24,41,43).

Se ha reportado que la vacunación con la cepa F induce una resistencia razonable contra la infección por cepas patógenas de campo y una disminución del número de organismos presentes por lo que teóricamente es posible que la vacunación continua de las parvadas de reproductoras pudiera eliminar las cepas de campo de MG y disminuir las pérdidas asociadas con la infección no solo en las reproductoras sino también en la progenie. Aunque la vacunación con la cepa F reduce las pérdidas en la producción de huevo y la transmisión vertical, no las elimina totalmente, por lo que en un momento dado sería necesario la utilización de cepas menos patógenas (TS-11) para la vacunación o dejar de vacunar y depender de medidas de bioseguridad y aislamientos estrictos, en combinación con pruebas serológicas. (39,41).

SINOVITIS INFECCIOSA.

La infección por *Mycoplasma synoviae* (MS) se presenta con más frecuencia como una infección subclínica del aparato respiratorio superior o puede presentarse en forma sistémica produciendo sinovitis infecciosa (6). Cuando logra descender a las partes bajas del aparato respiratorio coloniza entonces sacos aéreos causando aerosaculitis, sobretodo cuando se asocian agentes complicantes como virus vacunales o de campo de newcastle o bronquitis infecciosa.(31)

SINONIMIAS

Sacos aéreos silenciosos (1).
Tenovaginitis infecciosa de las aves. (1).

ETIOLOGIA.

La enfermedad se origina por *Mycoplasma synoviae*. Para su cultivo requiere dinucleótido nicotinamida adenina (NAD) (1,6,44).

EPIZOOTIOLOGIA.

Su distribución es mundial. En México, las encuestas realizadas en años recientes indican la prevalencia de MS en un 40% de las reproductoras, en 70% del pollo de engorda y en el 75% de la gallina de postura.(51).

Los pollos, pavos y gallinas de guinea, son los huéspedes naturales (6,44). Los patos, gansos, pichones, codorniz japonesa y las perdices patas rojas, se pueden encontrar infectados de manera natural. Los faisanes, gansos y los pericos son susceptibles por inoculación artificial. Los gorriones caseros se pueden infectar de manera artificial pero son muy resistentes. Los conejos, ratas, cobayos, ratones, cerdos y corderos no son susceptibles a la infección experimental.(6).

La infección natural en pollos se observa desde una semana, pero la infección aguda en general se ve en pollos jóvenes de 4-16 semanas de edad y los pavos de 10-24 semanas de edad (6,44). La infección crónica sigue a la fase aguda y puede persistir por toda la vida de la parvada. La etapa crónica se puede ver a cualquier edad y en algunas parvadas no va precedida por infección aguda.(6).

La enfermedad ocurre más frecuentemente durante los meses de invierno y los factores del medio ambiente tales como la temperatura, humedad, amoníaco y polvo tienen mucho que ver.(44).

TRANSMISIÓN

A través del huevo, por vía aerógena y por contacto (1,12,17). Cuando se llegan a infectar parvadas de reproductoras durante la producción de huevo, el índice de transmisión en el huevo es más alto durante las primeras 4 a 6 semanas después de la infección; la transmisión puede cesar, pero las parvadas infectadas puede transmitir MS en cualquier momento.(6) Por lo que los huevos utilizados para la producción de vacunas con virus vivo se deben obtener de parvadas libres de MS.(6,44)

PERÍODO DE INCUBACION.

El periodo de incubación varía entre 2 y 21 días, de acuerdo con la ruta de exposición.(44).

La sinovitis se ha observado en pollitos de 6 días de edad, lo cual sugiere que el periodo de incubación puede ser relativamente corto en aves infectadas por transmisión por huevo. El periodo de incubación después de la exposición por contacto es por lo general, de 11 a 21 días.(6).

SIGNOS CLINICOS.

La presentación subclínica se da en las aves de cualquier edad, haciéndose manifiesto luego de la infección de un virus respiratorio vacunal o de campo, prolongando el tiempo del problema respiratorio. En gallinas de postura y en aves reproductoras, MS tiende a causar una infección respiratoria o sistémica en individuos durante toda la vida de la parvada, provocando con esto una menor viabilidad, menor producción de huevo, menor fertilidad y menor incubabilidad general.

La enfermedad se observa con mayor frecuencia en aves en desarrollo de 4 a 12 semanas. Las primeras signos incluyen palidez de la cresta, cojera, crecimiento retardado, se toman indiferentes, deshidratadas, extenuadas, aunque las aves se encuentren muy enfermas, muchas continúan comiendo y bebiendo si se encuentran cerca del alimento con una recuperación lenta, sin embargo la sinovitis puede persistir durante toda la vida de la parvada. Las articulaciones se inflaman, principalmente en las áreas tarso-metatarsianas y del cojinete plantar y son comunes las ámpulas en el pecho (1,6,44). En otros casos, no hay o no se nota la fase aguda y sólo se ven unas cuantas aves enfermas de manera crónica en una parvada. Los pollos infectados vía el aparato respiratorio pueden mostrar estertores ligeros en 4 a 6 días o pueden ser asintomáticos. (6).

En pavos, por lo general, ocasiona el mismo tipo de signos que en pollos. La claudicación es el signo más visible.(6).

MORBILIDAD Y MORTALIDAD.

En pollos la morbilidad en parvadas con sinovitis clínica varía, siendo 5-15 % la más usual. La afección respiratoria, por lo general, es asintomática, pero de 90-100 % de las aves pueden estar afectadas. La mortalidad, por lo común es del 1-10% . (6,31).

En las reproductoras la fertilidad se ve disminuida entre un 0.5 y 4% y se incrementa el número de embriones picados no nacidos, llegando entre el 1 y el 5% del nacimiento total. La mortalidad de las gallinas es baja, aumentando en solo 1% en todo el ciclo de postura (51)

En los pavos la morbilidad en parvadas infectadas, por lo general, es baja 1-20 %, pero la mortalidad por pisoteo y canibalismo puede ser significativa.

LESIONES MACROSCOPICAS.

En las primeras etapas de la sinovitis infecciosa, las aves con frecuencia presentan un exudado gris o cremoso que afecta las membranas sinoviales de las cubiertas de los tendones, articulaciones y membranas bursales de la quilla y hepatoesplenomegalia (1,6,44). En casos crónicos, puede ocurrir también una inhibición del desarrollo del hueso sesamoideo, y una osteoartritis degenerativa. (44).

En general, no se ven lesiones macroscópicas en el aparato respiratorio superior, pero se puede encontrar aerosaculitis cuando se da en conjunción con la enfermedad de Newcastle y/o vacunación contra bronquitis infecciosa (6,44). Las infecciones mixtas por MS y una cepa atípica de *Pasteurella gallinarum* producen lesiones más severas. (14)

Ha sido demostrado que MS produce endocarditis y lesiones valvulares en pollos infectados entre 2-20 semanas de edad. Los cambios hematológicos incluyen monocitosis, heterofilia y anemia con valores de eritrocitos y hemoglobina bajos. (44).

En pavos, las hinchazones de las articulaciones pueden no ser tan prominentes como en pollos, pero a menudo se encuentra exudado fibrinopurulento, cuando se abren las articulaciones. Las lesiones en aparato respiratorio son variables. (6).

HISTOPATOLOGIA.

Las articulaciones, en particular las del pie y del corvejón, tienen un infiltrado de heterófilos y fibrina en espacios articulares y en las cubiertas tendinosas. Las membranas sinoviales son hiperplásicas con formación vellosa y un infiltrado nodular subsinovial de linfocitos y macrófagos. Las superficies cartilaginosas, con el tiempo, se decoloran, adelgazan o pican. Los sacos aéreos pueden tener lesiones benignas que consisten en edema, proliferación capilar y acumulación de heterófilos y restos necróticos en la superficie a lesiones más graves con hiperplasia de células epiteliales, un infiltrado difuso de células mononucleares y necrosis caseosa. Otras lesiones vinculadas con MS son hiperplasia del sistema de monocitos y macrófagos relacionado con las cubiertas arteriales de bazo, infiltrados linfoides en el corazón, hígado y molleja, y atrofia tímica y de la bursa. (6).

Se ha aislado del cerebro, tráquea y articulaciones de pollo una cepa de MS que es similar en cuanto a las bandas de proteínas a la cepa WVU 1853; sin embargo el perfil de proteínas fue marcadamente diferente. Esta cepa se encontró en encefalos de pollos de engorda con signos nerviosos. El examen histológico de los cerebros reveló la presencia de vasculitis meníngea leve a severa. La vasculitis observada varió desde una necrosis fibrinosa con escasa inflamación, hasta una marcada infiltración de linfocitos y células plasmáticas que alteraban la arquitectura de la pared de los vasos sanguíneos, al acumularse perivascularmente e involucrar las meninges circundantes. (11).

INMUNIDAD.

La inoculación parenteral de MS a menudo deprime al ave antes de desarrollar una respuesta adecuada. La resistencia a las lesiones inducidas por MS es dependiente de la bursa, mientras que los linfocitos dependientes del timo pueden ser necesarios para el desarrollo de lesiones sinoviales macroscópicas. (6).

A los linfocitos B se les ha relacionado con el desarrollo de resistencia contra las lesiones, mientras que los linfocitos T son necesarios para la aparición de sinovitis macroscópica. Durante la segunda semana de infección aparece una respuesta inmune celular y puede ser que su contribución al desarrollo de las lesiones sea un efecto citotóxico. La enfermedad estimula la formación del factor reumatoide, que aparece en respuesta a los complejos formados por la inmunoglobulina del huésped y el antígeno del micoplasma.

DIAGNOSTICO.

Para llegar a un diagnóstico integral se puede practicar las siguientes pruebas. (6,16,35,37,44).

Aglutinación rápida en placa.
 Inhibición de la hemoaglutinación.
 Microaglutinación.
 ELISA.
 Inmunofluorescencia.
 Inhibición de crecimiento y metabólica.
 Aislamiento e identificación.
 Reacción en cadena de la polimerasa.

Se sugiere que la prueba de ELISA puede ser considerada como una prueba serológica primaria en vez de la prueba de aglutinación rápida en placa que puede fallar en detectar tempranamente a los lotes infectados por MS, y la reacción en cadena por la polimerasa puede ser considerada como una prueba confirmatoria.(16).

DIAGNOSTICO DIFERENCIAL.

Esta enfermedad se debe diferenciar de la enfermedad crónica respiratoria y de problemas de artritis ocasionada por *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Pasteurella sp*, *Salmonella sp* y *arthritis viral por reovirus*. (44).

TRATAMIENTO.

De los antibióticos utilizados para el tratamiento la tilosina tiene la más alta efectividad, seguido por clortetraciclina, lincomicina, oxitetraciclina, espectinomina, tetraciclinas, neomicina y eritromicina, pero la combinación de oxitetraciclina-neomicina y lincomicina-espectinomina tienen una actividad micoplasmicida mayor que cualquiera de los antibióticos utilizados por sí solos. (44).

En general, la medicación apropiada es de valor en la prevención de aerosaculitis o sinovitis, pero el tratamiento si ya hay lesiones es menos efectivo. La medicación de antibióticos no elimina la infección de MS de la parvada.(6).

El tratamiento en agua de bebida con fluoroquinolonas en dosis de 10 mg por kilo de peso vivo, es actualmente una de las más usadas.(31).

PREVENCIÓN Y CONTROL.

Los métodos utilizados para el control de MS radica principalmente en evitar la transmisión de la enfermedad por medio de huevo. Esto incluye la compra de pollitos provenientes de parvadas libres de MS , segregación con procedimientos estrictos de higiene, monitoreo serológico regular, tratamiento del huevo fértil con antibióticos y temperatura, y medicación de los pollitos y aves adultas. (6,44).

La vacunación con VAXSAFE-MS, una cepa viva mutante y termosensible (crece a menos de 33°C) de *Mycoplasma synoviae* denominada MS-H ha sido de gran ayuda, primero en el control de la enfermedad y luego en los planes de erradicación en varios lugares del mundo y de México.(51)

Algunas de sus características más importantes son que no revierte a patógena, no infecta a otro tipo de aves, no es dañina para el hombre ni para los mamíferos, no se transmite verticalmente y se aplica 1 vez en toda la vida de las aves. La vacuna debe descongelarse bajo suave agitación en agua a 32-35 °C, lo cual tarda aproximadamente

de 3 a 5 minutos ya que viene congelada en hielo seco a menos 17 °C. Una vez descongelada, la vacuna debe de ser aplicada vía ocular a aves sanas a partir de los 14 días de edad de las aves y hasta antes de iniciar la postura.(51)

El tiempo que dura la vacuna en forma viva mientras se realiza la aplicación ocular es de hasta 2 horas sin problema alguno de afectación al título vacunal. No se recomienda ninguna otra vía de aplicación.(51)

Cuando la cepa es aplicada a pollitas libres de MS, tiene la capacidad de colonizar el tracto respiratorio superior de las aves y con esto evitar que infecciones subsecuentes de MS causen daño a estas aves vacunadas ya que no permite que las cepas de campo lleguen por vía sistémica a las articulaciones, al aparato reproductor ni al aparato respiratorio inferior. (51)

Si se reciben pollitas ya infectadas por vía vertical, es necesario que las aves tengan un tratamiento fuerte de antimicoplásmicos durante los primeros 10 días de vida y luego sean vacunadas con esta cepa a los 14 días de edad (luego de 4 días sin tratamiento).(51)

Las parvadas vacunadas serán seropositivas por cualquier método que se desee probar hasta las 60 semanas de edad, término dentro de la cual también se podrá reaislar la cepa MS de la hendidura palatina de las aves.(51).

DIAGNOSTICO AVICOLA. (5)

La función principal del Médico Veterinario Zootecnista especialista en aves es participar en los sistemas de producción avícola estableciendo las acciones necesarias para obtener mayor productividad y rentabilidad posible para el avicultor.

Entre los factores que afectan de manera importante a la productividad de las granjas avícolas resaltan los problemas de salud, por lo que una gran parte de las actividades de éste profesionista está encaminada a la prevención, tratamiento y control de dichos problemas.

La clave para realizar satisfactoriamente dichas medidas es reconocer los problemas sanitarios presentes en la parvada, esto se puede alcanzar mediante un proceso de diagnóstico.

METODOLOGIA DE DIAGNÓSTICO.

La metodología de diagnóstico para las enfermedades de las aves es un proceso ordenado, sistemático que incluye dentro de sus pasos:

Establecer la historia clínica de la granja.

Realizar el examen clínico de la parvada.

Realizar el examen de necropsia.

Seleccionar conservación y envío de muestra para confirmar el diagnóstico clínico por estudios de laboratorio.

Formular un diagnóstico definitivo.

HISTORIA CLINICA.

La historia clínica o anamnesis consiste en la recopilación de datos sobre los hechos que antecedieron y/o están relacionados con la manifestación de un problema sanitario o de improductividad en la parvada. Este acopio de datos se obtiene mediante un interrogatorio extenso a la persona que presenta el caso.

La historia clínica proporciona una visión clara y amplia de las condiciones de la granja y del proceso morbosos, es útil para la formulación de archivos con información sobre la salud en la explotación en la zona e integra la información necesaria para orientar el diagnóstico del problema.

INSPECCION CLINICA.

El examen clínico tiene la finalidad de detectar signos presentes en las aves que pueden sugerir el tipo de problema y consta de:

a) Inspección de la parvada. Se debe de observar la actitud de las aves, sonidos extraños, revisión de la cama, equipo y medio ambiente de la caseta.

B) Inspección clínica de las aves antemortem. Es un examen directo de las aves y debe contemplar la revisión completa por aparato y sistemas.

EXAMEN DE NECROPSIA.

La necropsia es la disección, rápida, ordenada y sistemática de un cadáver que permite descubrir, definir e interpretar las lesiones macroscópicas.

De las observaciones hechas en la necropsia, se obtiene el diagnóstico morfológico

En el exámen de necropsia se debe realizar lo siguiente:

Inspección externa del ave.

Revisión del tejido subcutáneo.

Inspección de las cavidades con relación al tamaño y relación de los órganos, presencia de líquidos anormales, examen de pleura, peritoneo y sacos aéreos.

Inspección del aparato digestivo.

Inspección del sistema respiratorio.

Inspección del aparato urinario.

Inspección del aparato reproductor.

Inspección del aparato músculo-esquelético.

Inspección del sistema nervioso.

Inspección del sistema inmunocompetente.

Para la selección y obtención de las muestras conviene seguir un plan cuidadoso, que contemple las muestras que se van a obtener, determinar el estudio que se debe de realizar y considerar los alcances o limitaciones del tipo de resultados que se van a obtener.

Al momento de obtener la muestra, es importante conocer la patogenia y el tropismo del agente que se desee aislar, para tener la certeza que se encuentra en el órgano o tejidos seleccionados. Por otra parte es importante que sea representativa de la parvada.(36).

Mediante el uso e interpretación de los estudios de laboratorio se pueden confirmar o descartar un diagnóstico clínico. Para que las pruebas se puedan aplicar al diagnóstico avícola de rutina, deben ser sensibles, específicas, repetibles, sencillas y accesibles.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN

TOMA DE MUESTRAS.

La colección de muestras para el aislamiento de micoplasmas debe hacerse en la fase aguda de la enfermedad debido a que el número de microorganismos es mayor.(6,23) Frecuentemente las muestras que van a colectarse, se deben seleccionar en base a los signos clínicos en vez de las lesiones observadas en la necropsia. Por ejemplo, el líquido sinovial se deberá coleccionar de los animales con historia de claudicación aguda, se observen o no lesiones. De igual forma, se deben obtener tejidos cerebrales de los animales que presenten lesiones del SNC; tomar muestras de exudados nasales o materiales de pulmón de los animales que muestren signos respiratorios o en caso de aves viejas se prefiere tomar muestras también de la cloaca.(12,25). Además de lo anterior, se debe coleccionar muestras de cualquier tejido que presente cambios patológicos a la necropsia, o de los líquidos corporales y exudados que muestren cambios en cantidad o apariencia. Siempre que sea posible, las muestras deben tomarse con medidas de asepsia estrictas y antes de que se aplique un tratamiento con antibiótico. Una contaminación bacteriana ligera puede evitarse mediante el uso de inhibidores bacterianos en medios de aislamiento.(12).

Si el material clínico que va a cultivarse se obtiene de lesiones profundas, existe una gran posibilidad de aislar, en cultivo puro, al micoplasma patógeno particular. Sin embargo, cuando se intenta aislar micoplasmas de las vías respiratorias altas o de las mucosas genitales, un gran porcentaje de los aislamientos contienen más de una especie de micoplasma.(12).

Los líquidos de las lesiones se coleccionan con mayor frecuencia con aguja y jeringa estériles. Debido a que el algodón y algunas otras fibras contienen sustancias tóxicas para los micoplasmas y también debido a que la desecación es nociva para estos gérmenes, se aconseja que el uso de hisopos se limite a las ocasiones en donde la muestra pueda transferirse inmediatamente y directamente al medio de cultivo de micoplasma. Si es inevitable una pequeña tardanza, el material del hisopo deberá transferirse a una pequeña cantidad de solución salina amortiguadora. Para conservar las muestras durante más tiempo se recomienda la congelación con hielo seco en cuyo caso se debe añadir una pequeña cantidad de una proteína no inhibitoria. Si se desean inhibidores bacterianos, se pueden añadir penicilinas y las muestras se deben mantener bien cerradas para que el CO₂ sublimado altere drásticamente el pH del medio de suspensión.(12).

El examen de muestras de tejidos para detectar cambios microscópicos o histopatológicos es de poco valor en el diagnóstico de las enfermedades causadas por micoplasmas, ya que los cambios no son patognomónicos de la infección. El tamaño tan pequeño de los micoplasmas generalmente excluye el uso del microscopio de luz común para visualizar a los microorganismos en la lesión.(12).

MEDIO DE CULTIVO

Preparación del medio de cultivo Frey's.

Se realiza el aislamiento e identificación mediante el uso del medio de Frey's; que se preparará bajo la siguiente fórmula:

Base de caldo de Mycoplasma	22.5 g
Extracto de levadura	16ml
Glucosa	3 g
Suero de equino	120 ml
Dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD)	0.1 g
Rojo de fenol	2.5 ml
Penicilina G Potásica	1 000 000 unidades
Agua destilada	cuanto baste para 1000 ml
Ajustar el pH a 7.8 con 20% de NaOH.	

.(Kleven, 1996).

Algunos ingredientes que constituyen el medio de Frey's requieren ser sometidos a diversos procedimientos antes de ser utilizados para elaborar el medio. El extracto de levadura se puede preparar a partir de levadura de cerveza para pan (se disuelve un bloque de 400 grs de levadura de cerveza para pan en un litro de solución amortiguador fosfato (PBS) calentando a una temperatura de 80 °C durante una hora agitando regularmente y después dejar reposar 24 hrs). La levadura se centrifuga a 2500 rpm durante 15 minutos en 4 ocasiones y se ajusta el pH a 7.2. Se filtra y para su conservación guardar en refrigeración a -20°C hasta el momento de su utilización.(19)

Al agua destilada se le agrega el medio de PPLO, glucosa, rojo de fenol y el NAD, se mezcla, se clarifica por calor y se esteriliza en autoclave a 121° C, 15 lb, 15 minutos. (19).

El extracto de levadura, suero de equino, y penicilina serán adicionados en forma aséptica al medio base después de ser filtrados (filtro millipore con una membrana de 0.22 y papel filtro del No. 4) y de haber pasado la prueba de esterilidad que consiste en incubar a una temperatura de 37°C durante 24 horas.(19)

Para el cultivo de *Mycoplasma synoviae* se requiere de utilizar suero de cerdo

Los medios basales Frey's serán distribuidos en tubos estériles con tapón de baquelita y contendrán 3 ml cada tubo.(19,27)

Para la preparación del medio sólido se utilizarán los mismos componentes, sólo que dentro de ellos se utilizará también el agar noble, que es el que le da la consistencia al medio de cultivo. Dicho agar noble será adicionado en una concentración de 10 gr/l de medio de Frey's; este será colocado en cajas de petri de vidrio estériles. Una vez sembrados los Micoplasmas serán colocados en cámaras de velobiosis. (21,22).

MÉTODOS DE CULTIVO.

El medio de Frey's con suero de cerdo, es quizá el medio más usado comúnmente en los micoplasmas aviarios, pero también se puede emplear el medio PPLO. Se usan hisopos para tomar las muestras y se inoculan al medio líquido o a las placas de agar. Se considera que los cultivos en medio líquido son de lo más sensibles para la mayoría de las especies, pero la inoculación directa en placa a menudo resulta exitosa.(25)

La incubación se realiza a 37 °C; bajo una atmósfera microaerofílica de 15% de CO₂ y se transfiere el cultivo en caldo al medio sólido después que se haga evidente la turbiedad o el cambio de pH a naranja o amarillo. En *M. gallisepticum* y *M. synoviae*, el primer cambio de color ocurrirá a los 3-4 días, pero esto puede ocurrir tan tardíamente como lo pueden ser 14 días o más dentro del proceso de incubación; no deseche los cultivos durante un mes. No se deben de incubar los cultivos después que se vuelven ácidos ya que se pueden inactivar ante un pH bajo (especialmente *M. synoviae*). A todos los cultivos se les coloca en placas después de una semana de incubación aún cuando no ocurra un cambio de color.(25).

Después de realizado el cultivo en placas, a los 3 días ya se puede observar a la primera colonia de la especie patógena, aún es más común que esto pase a los 4 o 5 días y se les detecta por medio de un examen con un microscopio estereoscópico. Se deben incubar las placas de agar en un recipiente cerrado que contenga una toalla de papel húmedo para impedir la deshidratación.(25)

Una de las dificultades cuando se aíslan los micoplasmas aviarios patógenos es la presencia frecuente de *M. gallinaceum* y *M. gallinarum*. Los cultivos de Frey's líquidos que muestren un cambio de color ácido dentro de un lapso de 24 horas, a menudo contienen *M. gallinaceum* o bacterias contaminante y si las colonias se desarrollan tan prontamente como a las 24 horas de incubación, es posible que estén presentes *M. gallinaceum* y/o *M. gallinarum*. Cualquiera de esas especies hará que haya un incremento rápido y excesivo de las especies patógenas en cultivos en caldo si se permite que haya una incubación de 24 horas o más. Si cualquiera de esos organismos interfieren en el proceso de aislamiento de los micoplasmas patógenos, podría ser exitoso hacer un cultivo directo en placas de agar. Las colonias que aparecen después de 24 horas no son patógenas.(25)

TECNICA DE AISLAMIENTO.

El procedimiento en secuencia será el siguiente:

1. Se toman muestras de senos o de las articulaciones de las patas afectadas.
2. Cultivar en medio líquido de Frey's mediante el método de dilución logarítmica 10³ de la muestra original e incubar a 37 °C en posición semihorizontal durante 3 a 7 días y examinar diariamente.

Observaciones:

- a) No contaminados. Pasar al punto 3
- B) Los Contaminados, Se filtran a 0.45 micras. Pasar al punto 3

3. Se realizan subcultivos en medio de Frey's líquido y sólido. Se observa diariamente, durante los primeros 3 a 4 días y después a los 7 días. El medio sólido se incuba en una atmósfera microaerofílica de 15 % de CO₂ y se examina en un campo estéril con microscopio estereoscópico, utilizando luz indirecta

Observaciones:

- a) Contaminados se filtran a 0.45 micras. Pasar al punto 3
- b).Crecimiento después de 7 días. Pasar al punto 4
- c).Crecimiento en medio líquido. Pasar Al punto 5
- d).Crecimiento en medio sólido. Pasar al punto 4 y 6

4. Se realizan subcultivos en medio de Frey's líquido, se observarán diariamente durante los 3 a 4 días y después a los 7 días.

Observaciones:

- a).Crecimiento en medio sólido a los 3 ó 4 días. Pasar al punto 7
- b).No crecimiento en el medio. Pasar al punto 5
- c).Desechar las cajas del medio sólido en las que no hubo crecimiento.

5. Se realizan subcultivos de los medios de Frey's líquidos y sólidos; se repetirán a intervalos de 2 días con el objeto de obtener el aislamiento.

Observaciones:

- a).Crecimiento en medio sólido. Repartir paso 4 y continuar 6
- b).Las que no crecieron después del cuarto subcultivo se desechan.

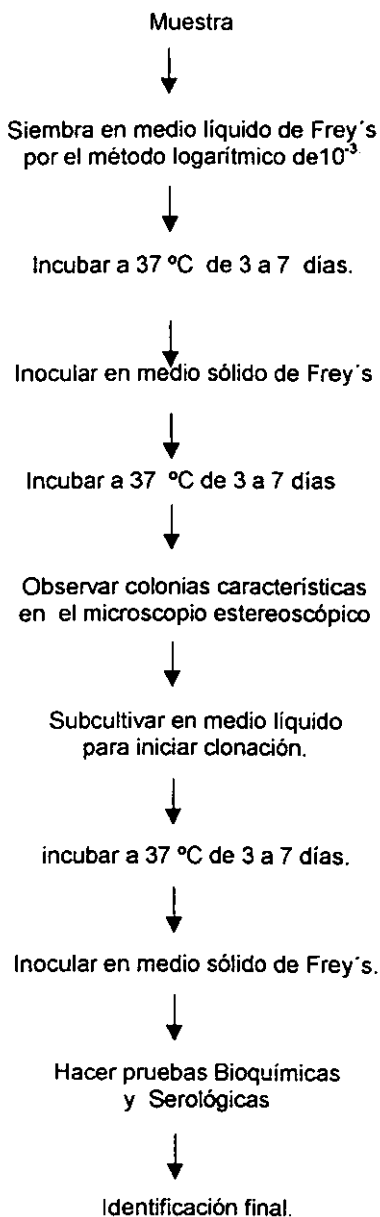
6. Se separarán los diferentes tipos de colonias (Clonación). Pasar al punto 7 y 8

7. Se congelarán en medio líquido a -70°C

8. Se realizarán pruebas bioquímica y serológicas.

En medio líquido cualquier cambio en el pH indicado por el rojo de fenol se considerará como crecimiento positivo.

DIAGRAMA PARA EL CULTIVO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE
MICOPLASMAS AVIARES.



PRUEBAS BIOQUIMICAS DE CARACTERIZACION. (21)

PRUEBA DE DEPENDENCIA DE ESTEROLES.

Los micoplasmas son microorganismos que requieren esterole para su metabolismo, pero son incapaces de sintetizarlos, por lo que se debe adicionar colesterol en cantidades elevadas en los medios de cultivo para su crecimiento, a diferencia de los acholeplasmas que no requieren esterole. En base a esta diferencia, con esta prueba podemos determinar a la familia a la que pertenece los microorganismos, es decir, si es dependiente de esterole pertenecerá a la familia Mycoplasmataceae y será Acholeplasmataceae si no lo es.

PRUEBA DE DIGITONINA.

El papel que desempeña la digitonina en esta prueba de sensibilidad, se debe a la formación de un complejo con el colesterol presente en el medio de cultivo. Este complejo se debe a una reacción de precipitación y se conoce como el digitónido del colesterol siendo este un complejo molecular disociable, que está formado por cantidades equivalentes de ambos compuestos químicos. Una vez que se ha formado este digitónido, por medio de un halo blanco alrededor del disco de papel filtro, ya no queda disponible el colesterol del medio y los microorganismos no pueden tomarlo del medio para incorporarlo a sus membranas.

MATERIAL.

Digitonina	15 mg
Etanol	0.1 ml

PROCEDIMIENTO.

Colocar en disco, .025 ml a cada uno.
 Secarlo durante la noche a 37 ° C.
 Almacenarse a temperatura de 4 - 10 °C.
 (Estable por varios meses).

INTERPRETACION.

Zona de inhibición: Especies de Mycoplasma.
 Zona de no inhibición: Especies de Acholeplasma.

Controles: Para Mycoplasma: *M. arginini* o *M. bovis*.
 Para Acholeplasma : *A. laidlawii*.

Nota: La digitonina es prácticamente insoluble en agua; 1 gr se disuelve en 57 ml de alcohol absoluto o en 220 ml de alcohol al 95 %

PRUEBA DE FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS. GLUCOSA.

Ya que la fermentación es un proceso de óxido-reducción anaeróbicos en el cual un sustrato orgánico sirve como aceptor final de hidrógeno en lugar del oxígeno, los productos finales son ácidos y el más común es el ácido láctico. Sin embargo se obtienen otros productos que van a depender del tipo de fermentación que utilicen los microorganismos de acuerdo con sus requerimientos nutricionales y energéticos.

La prueba de fermentación de carbohidratos, nos sirve para determinar la capacidad de la degradar un determinado carbohidrato en un medio de cultivo líquido. Entre los carbohidratos más utilizados están. glucosa, fructuosa, manosa, inositol y dulcitol.

MEDIO.

A. Cultivo PPLO	70 ml.
Extracto de levadura fresco, solución al 25%.	10 ml.
suero inactivado de cerdo o de caballo	10 ml o 20 ml.
Glucosa , solución al 50 %.	1 ml.
Penicilina, 200,000 unidades/ ml.	0.5 ml
Fenol rojo, solución al 1%.	0.4 ml.
B. Como el anterior pero omitir la glucosa. Colocarlo en volúmenes de 5 ml.	

PROCEDIMIENTO.

Preparar el cultivo de 24 horas. (con 10 ml de suero, si crece).

Inocular aproximadamente 0.05 ml / tubo.

1. Cultivo con glucosa.
2. Cultivo sin glucosa.

incubar a 37 °C.

Subcultivo después de 24 a 48 horas para confirmar el crecimiento.

Continuar la incubación hasta 14 días si es necesario.

Observar y registrar algún cambio en el pH .

INTERPRETACION.

Con la producción de ácidos el medio se toma a una coloración amarilla considerándolo como positivo.

Incubación de controles:

1. Cultivo no inoculado con glucosa.
2. Cultivo no inoculado sin glucosa.

PRUEBA DE LA HIDROLISIS DE ARGININA.

Esta prueba nos sirve para medir la capacidad enzimática que tienen los micoplasmas para descarboxilar un aminoácido como la L-arginina en un grupo carboxilo

para dar la formación de una amina o una diamina y anhídrido carbónico. La arginina es catabolizada a través de dos sistemas que puede ocurrir simultáneamente o en forma separada, estos sistemas son. el de la arginina dehidrolasa y el de la arginina descarboxilasa para dar la formación de citrulina y amoniaco.

MEDIO.

- | | |
|--|--------|
| A. Cultivo de PPLO, pH = 7 | 70 ml. |
| Extracto de levadura, solución al 25% | 10 ml |
| Suero inactivado de cerdo o de caballo | 20 ml |
| L-arginina solución HCL 10% | 5 ml |
| Penicilina, 200,000 U/ml. | 0.5 ml |
| Fenol, solución al 1% | 0.4 ml |
- B. Como el anterior pero sin arginina.
Colocar en volúmenes de 5 ml.

PROCEDIMIENTO.

Preparar cultivo de 24 horas.

Inocular 0.05 ml / tubo.

1. Cultivo con arginina.
2. Cultivo sin arginina.

Incubar a 37 °C.

Subcultivos después de 24 y 48 horas para confirmar el crecimiento.

Continuar la incubación hasta 14 días

Observar y registrar los cambios de pH.

INTERPRETACION.

Cuando el medio se toma de una coloración rojo oscuro se considerará la prueba como positivo (pH alcalino).

Incubación de controles:

1. Cultivo no inoculado con arginina
2. Cultivo no inoculado sin arginina.

PRUEBA DE HIDROLISIS DE LA UREA.

Sirve para detectar la capacidad que tienen los microorganismos para desdoblar la urea y dar lugar a la formación de dos moléculas de amoniaco, ya que la urea en solución se hidroliza dando como producto final carbonato de amonio. La ureasa es muy importante en la descomposición de los compuestos orgánicos nitrogenados como son las aminas ya que son hidrolizadas rápidamente. La enzima actúa sobre los enlaces C-N del compuesto orgánico con excepción de los que contienen enlaces peptídicos.

MEDIO.

- | | |
|--|--------|
| A. Cultivo de PPLO. pH : 7.2 | 70 ml. |
| Extracto de levadura, solución al 25% | 10 ml |
| Suero inactivado de cerdo o de caballo | 20 ml |

Urea en solución al 1%	
Penicilina, 200,000 U/ml.	0.5 ml
Fenol, solución al 1%	0.4 ml
B. Como el anterior pero sin urea.	
Colocar en volúmenes de 5 ml.	

PROCEDIMIENTO.

Preparar cultivo de 24 horas.

Inocular 0.05 ml / tubo

1. Cultivo con urea.
2. Cultivo sin urea.

Incubar a 37°C.

Subcultivos después de 24 y 48 horas para confirmar el crecimiento.

Continuar la incubación hasta 14 días si es necesario.

INTERPRETACION.

Una reacción positiva resultará en un color púrpura.

ACTIVIDAD DE LA FOSFATASA.

La actividad de la fosfatasa esta basada sobre la hidrólisis fenoltalenico difosfato dentro de una libre fenoltaleina. El difosfato de fenoltaleina es incolora, considerando que la fenoltaleina es roja en un pH 9-10. La hidrólisis puede estar determinada usando un medio liquido ó sólido. Se pueden usar ambos para comparar resultados, excepto que el método utilizando un medio sólido es menos intensivo en su labor.

MEDIO.

Cultivo de PPLO	74 ml.
Agar purificado	0,8 g
Autoclave	
Enfriar a 56 °C.	
Suero inactivado de caballo o de cerdo	20 ml
Extracto de levadura fresco, solución al 25%	20 ml
Difosfato fenoltalenico sodico, 1% w/v solución	1 ml
Penicilina , 200,000 unidades/ml	0.2 ml

PROCEDIMIENTO.

Inocular dos placas. inocular sólo la mitad de cada placa ya sea esparciendo o por derrame de gota, dejar la otra mitad sin inocular como control.

Después de la incubación de 3 ó 5 días a 37 °C de la placa, se hace la prueba con 5N NaOH, dejando correr una gota a través del lado de control y después al lado inoculado.

INTERPRETACION.

Si aparece un color rojo en 30 segundos, en el lado inoculado se considera la prueba como positiva; si no cambia de color se considera como negativo.

IDENTIFICACION.

Tabla de identificación de micoplasmas aviares

Mycoplasma Especies	Hospedador	Fermentación de la glucosa	Hidrólisis de la arginina	Actividad fosfatasa
<i>A. laidlawii</i>	Varios	+	-	+ o -
<i>M. anatis</i>	Pato	+	-	+
<i>M. anseris</i>	Ganso	-	+	-
<i>M. cloacale</i>	Pavo	-	+	-
<i>M. columbinasale</i>	Paloma	-	+	+
<i>M. columbinum</i>	Paloma	-	+	-
<i>M. columborale</i>	Paloma	+	-	-
<i>M. gallinarum</i>	Pollo	-	+	-
<i>M. gallinaceum</i>	Pollo	+	-	-
<i>M. gallisepticum</i>	Pollo y pavo	+	-	-
<i>M. gallopavonis</i>	Pavo	+	-	-
<i>M. glycyphilum</i>	Pollo	+	-	+ o -
<i>M. iners</i>	Pollo	-	+	-
<i>M. iowae</i>	Pavo	+	+	-
<i>M. lipofaciens</i>	Pollo	+	+	-
<i>M. meleagridis</i>	Pavo	-	+	+
<i>M. pullorum</i>	Pollo	+	-	-
<i>M. synoviae</i>	Pollo y pavo	+	-	-

Kleven. 1996.

PRUEBAS INMUNOLOGICAS

Un aspecto importante en la implementación y aplicación de pruebas inmunológicas para el diagnóstico avícola, es la disponibilidad de antisueros, ya que la extrema especificidad mostrada ante sus correspondientes antígenos los convierte en una herramienta útil como reactivos para dichas técnicas. (5).

Se han desarrollado una serie de pruebas inmunológicas con la finalidad de identificar a las diferentes especies de micoplasmas como son: La prueba de Inhibición metabólica, la prueba de inhibición de crecimiento y la prueba de inmunofluorescencia. Las dos primeras son muy similares ya que son pruebas de neutralización, la cual se lleva a cabo por medio de un antisuero homólogo, en el cual la actividad inhibitoria se encuentra relacionada con la absorción de los anticuerpos sobre los componentes antigénicos de la membrana que rodea a estos agentes, ocasionando una depresión del metabolismo y como consecuencia la muerte de la célula. La diferencia básica es que la prueba de inhibición metabólica se realiza en medio líquido utilizando una concentración baja de antisuero y la prueba de inhibición de crecimiento se realiza en medio sólido por lo que se requiere una concentración elevada de antisuero ya que los anticuerpos tienen que difundir a través del medio. En la prueba de inmunofluorescencia, también se utiliza un antisuero específico, esta prueba se realiza directamente sobre las colonias de micoplasma en un medio sólido y la obtención de colonias fluorescentes indican una reacción positiva.

OBTENCION DE ANTISUEROS.

La fuente más frecuente de anticuerpos es el suero; si dicha muestra proviene un animal inmunizado de acuerdo a un esquema determinado, se obtendrá un suero con anticuerpos específicos contra el o los antígenos inmunizantes, a éste se le denomina antisuero o suero hiperinmune.(5).

Dentro de la preparación de los antígenos para obtener antisueros se encuentra uno que los componentes del medio (especialmente el suero) absorben a las membranas del plasma de los micoplasmas en suficiente cantidad como para la inducción de títulos altos en contra de los componentes del medio en el huésped inmunizado. Una forma de enfrentar este tipo de problema es la de utilizar suero de una especie distinta del tipo de suero empleado en el medio de crecimiento. Por ejemplo, se puede utilizar suero de becerro para la producción de antígenos. Los anticuerpos de conejo en contra del suero de becerro no interfieren en los procedimientos que emplean nuestros medios normales, los cuales contienen suero de cerdo.(25).

Se obtiene un mejor título de anticuerpos cuando el antígeno se mezcla con una emulsión que contenga un adyuvante completo de Freund. Sin embargo, la respuesta inflamatoria local en el lugar de la inyección es severa, limitando el uso de este adyuvante.(25).

El suero hiperinmune de conejo que actúa en contra de *M. gallinarum* y *M. gallinaceum* puede retardar en crecimiento en los caldos de cultivo lo suficiente como para dejar que crezcan las especies patógenas hasta que alcancen su desarrollo.(25).

PREPARACION DEL ANTIGENO PARA INMUNIZAR. (21).

1. Se prepara de 500-1000 ml de cultivo. Usar 1% de fracción de suero ó 20% de suero de conejo en lugar de suero de caballo.
2. Centrifugar el cultivo a 15,000 g por una hora.
3. Filtrar a través de filtro de membrana de 0.22 μm para esterilizar
4. Inocular en cultivo. Incubar el tiempo necesario.
5. Centrifugar 15,000 g, 4 °C, 1 hora.
6. Lavar el sedimento 2 veces en PBS con pH 7.2-7.5.
7. Se vuelve a suspender el sedimento en 15-20 ml de PBS.
8. Se siembra en agar para verificar el crecimiento.
9. Se siembra en placas de agar de sangre para verificar su pureza.
10. Almacenar en volúmenes de 1 ml a -70 °C

PROTOCOLO DE INMUNIZACION.

Para la producción de antisueros es necesario considerar el uso de especies que produzcan respuestas inmunes aceptables a los antígenos. Como regla general la inmunogenicidad aumenta con la distancia filogenética entre la especie donadora del antígeno y la receptora. Los conejos son usados en la mayoría de los casos por responder a una gran variedad de antígenos, se pueden obtener volúmenes relativamente grandes de antisuero, son de fácil manejo y requieren de poco espacio para alojamiento (4).

Se recomienda inmunizar dos animales en caso de que uno produzca títulos no satisfactorios.(19,25,27).

Se sangrarán a los conejos para obtener suero y correr la pruebas de aglutinación en placa con antígeno de *M. gallisepticum* o *M. synoviae*, según el caso. (19,27).

DIA 0.

Emulsificar 2 ml de suspensión de antígeno con 2 ml de adyuvante completo de Freund. La emulsión está lista cuando una gota del antígeno en la superficie de agua no se esparce y se mantiene intacta. La cantidad recuperada de esta mezcla generalmente es alrededor de 3 ml.(21).

Inyectar 0.5 ml intramuscular en 4 diferentes sitios (2 ml en total) y .2 ml intradérmica en 4 sitios (0.8 ml en total).(25).

La aplicación intramuscular, facilita el rápido acceso a la circulación y nódulos linfáticos, pero en ausencia de un adyuvante los antígenos solubles se diluyen y se pierden.(4).

La aplicación intradérmica promueve un rápido acceso a linfáticos y puede ser útil con pequeños volúmenes de antígenos. (4).

DIA 21, 28, 35, 42.

Inyectar 0.5 ml del antígeno intramuscular en 4 sitios.(25).

Se sangran a los conejos para la obtención del suero, el cual será congelado en viales de manera individual a -20°C hasta su uso. Los conejos generalmente no producen buenos títulos de anticuerpos en la prueba de inhibición de la hemoaglutinación o reacciones fuertes en aglutinación en placa.(25).

Cuando el título de anticuerpos es suficiente el animal puede ser sacrificado.(21).

Se debe sangrar a los conejos después de 7 días de la última inyección o a más tardar a los 10 días.(21).

Si el título todavía no es satisfactorio, es preferible que se inmunice a otros conejos.(21).

DÍA 50.

Se sacrificarán a los conejos para la obtención del suero hiperinmune, previa anestesia con ketamina mediante sangrado intracardiaco e inhalación de eter hasta su muerte, se centrifugará la sangre a 2500 rpm durante 15 minutos y se titularán los sueros obtenidos de los conejos del día cero al día cincuenta mediante la técnica de Microaglutinación.(19,27).

TECNICA DE MICROAGLUTINACION. (19).

Esta técnica se puede emplear para obtener el título del suero hiperinmune de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae*. (22).

MUESTRA. Suero hiperinmune contra MG o MS.

MATERIAL

1. Biológico

Suero de equino

Antígeno diluido 1:10 de MG o MS.

2. De laboratorio.

Placa de microtitulación con fondo en U.

Solución amortiguadora de fosfato (PBS).

Pipeta de microtitulación (100 microlitros).

Parafilm.

Estufa bacteriológica.

Microscopio estereoscópico.

PROCEDIMIENTO.

1. Se va diluir el suero hiperinmune en una proporción de 1:5 de la siguiente forma:
2. En uno de los pozos de la microplaca se adiciona 80 μl de PBS y 20 μl de suero hiperinmune contra MS o MG, según sea el caso.
3. Adicione 50 μl de PBS a los 12 pozos de una fila.
4. De la dilución 1:5 se tomarán 50 μl y se colocarán en el primer pozo de la hilera. De esta manera se obtuvo en este pozo la dilución en proporción de 1:2 de la dilución 1:5.
5. Hacer diluciones seriadas de 50 μl , desechándose 50 μl del último pozo.

6. Se adiciona 50 µl de antígeno diluido 1:10 a los 12 pozos.
7. Cubra la placa con parafilm e incubar en estufa bacteriológica a 37 °C durante 24 horas.

Como control negativo, utilizar suero de equino al que se debe de realizar el procedimiento anterior.

INTERPRETACION.

Se considera como reacción positiva al momento de observar en microscopio estereoscópico la presencia de una malla de aglutinación en el fondo del pozo.

El título se reporta como el recíproco de la última dilución donde se observo la aglutinación.(19,27),

Se recomienda, al igual que en todas las pruebas serológicas, utilizar controles positivos y negativos para corroborar que el antígeno está reaccionando adecuadamente. (36)

VENTAJAS

La prueba de microaglutinación se considera una prueba de sensibilidad y especificidad aceptable comparadas con las pruebas de aglutinación en placa y inhibición de la hemoaglutinación. (27).

El ahorro en espacio, costo, cantidad de suero y antígeno utilizados, además de su fácil interpretación hacen aceptable esta prueba.(27)

Detección de reacción cruzada.

La reacción cruzada se realizará también con la implementación de la técnica de microaglutinación mencionada anteriormente. De los conejos que se inocularán con *M. gallisepticum*, se correrá la prueba con antígeno *M. synoviae* y a los conejos que se inocularán con *M. synoviae*, se correrá la prueba con antígeno de *M. gallisepticum*

PRUEBA DE INHIBICION DE CRECIMIENTO. (21).

Para la realización de esta prueba se requieren de cultivos de microorganismos a probar en medio sólido a los cuales se les coloca un disco con el antisuero homologo. Esta técnica es recomendada para especificar la especie, pero no para cuantificar anticuerpos y es el método de elección para evaluar antisuero durante la prueba de inmunización.

MATERIAL.

Discos de papel estéril de 5 mm de diámetro.
Microscopio estereoscópico

BIOLOGICOS.

Cultivos puros de *Mycoplasma gallisepticum* ó *Mycoplasma synoviae*.
Antisuero homologo a *Mycoplasma gallisepticum* ó *Mycoplasma synoviae*.

PROCEDIMIENTO.

Se tomarán colonias de un cultivo fresco de *Mycoplasma synoviae* o *Mycoplasma gallisepticum* (según el caso) : dicho cultivo deberá tener de 48 a 96 horas de crecimiento, se sembrarán en medio sólido de Frey's.

El título de inoculación deberá estar en el rango de 10^4 UFC/ml. Por otro lado los discos de papel estéril se impregnarán con el antisuero homólogo (0.025 ml de antisuero / disco) también estéril; estos discos de papel filtro serán colocados sobre la superficie del agar sembrado. Se incubarán a 37 grados centígrados con 10% de dióxido de carbono durante 5 días. En caso de que se observara una zona de inhibición de crecimiento esta se considera como una reacción positiva a la identificación.

INTERPRETACION.

Zonas de 2 mm de inhibición deberán considerarse equivocadas.(21,19,30).

Zonas de 5 mm ó más de inhibición se considerará como positiva.(19,27).

Se deben utilizar controles positivos y negativos, utilizando los mismos criterios de observación (27).

INHIBICION METABOLICA. (21).

La prueba de inhibición metabólica es una técnica de inhibición de crecimiento que se lleva a cabo en un medio líquido. Tiene la especificidad de la prueba de inhibición de crecimiento pero es más sensible. Esta prueba es una de las más confiables para la identificación de micoplasmas. Para la realización de la prueba se requiere de cultivos que estén a una concentración de 10^4 unidades formadoras de colonias y antisueros homólogos contra los micoplasmas a probar.

Esta técnica se basa en el hecho que los micoplasmas se multiplican en un medio líquido que contiene un sustrato específico y el metabolismo de este sustrato alterará el pH, por lo cual, se observará un cambio de coloración del medio. La actividad inhibitoria del antisuero homólogo hacia los micoplasmas bajo prueba disminuirá el metabolismo celular acumulado y por lo tanto, evitará indirectamente el cambio de color. La prueba se realiza en una placa de microtitulación de 96 pozos a los cuales se les agrega una cantidad constante de antígeno con el medio de cultivo conteniendo el sustrato que puede ser glucosa, arginina, urea o tetrazolio, el antisuero homólogo se adiciona a los pozos en diluciones seriadas de 1:2 , se incuban a 37°C , se revisan diariamente y el título de la prueba será aquella dilución más alta de antisuero en el cual se observa un cambio de coloración del medio.

Esta prueba se puede utilizar para identificar cepas puras o aisladas con antisueros conocidos y valorados o para evaluar la potencia de un antisuero con cultivos conocidos. La prueba se lee a los 3-10 días. Resulta más útil para la detección de las diferencias antigénicas intra especies que la prueba de inhibición de crecimiento ya que se puede detectar claramente la diversidad antigénica. La prueba también es efectiva para determinar los títulos de los anticuerpos usando cultivos conocidos.

CONTROLES

CONTROL DEL MEDIO: El medio específico menos el micoplasma y el antisuero de prueba.

CONTROL DEL MICOPLASMA: El medio específico más el micoplasma y menos el antisuero de prueba.

CONTROL DEL MEDIO EN EL PUNTO FINAL: El medio específico con el pH ajustado al punto final deseado, es decir, 0.5 unidades de pH por encima o por debajo del control del medio.

Se lee la prueba cuando el medio de los controles de micoplasma es del mismo color que los controles del medio en el punto final.

Por lo general, los resultados se obtienen de los 1-6 días.

RECOMENDACIONES

Los resultados son más favorables si se reparten los cultivos en alícuotas, se les almacena a -70°C , y se usa una alícuota descongelada para cada prueba. Se recomienda filtrar el cultivo a través de una membrana de .45 mm, para obtener una suspensión de células individuales, especialmente en el caso de los cultivos que crecen rápidamente. Los antisueros inhibirán la multiplicación de células individuales con más eficacia que la agrupación de los organismos. Cada alícuota descongelada debe ser valorada para determinar la dilución apropiada para así obtener las 100-1000 unidades de cambio de color (CCU) / volumen unitario usados en la prueba.

El antisuero bajo prueba así como otros componentes líquidos de la prueba deben esterilizarse.

Los títulos de anticuerpos bajos se pueden ver escondidos o oscurecidos por los cambios de color causados por los contaminantes bacterianos en las diluciones más bajas del suero.

El antisuero de un animal que este recibiendo una terapia con antibióticos podría inhibir la multiplicación del micoplasma y mimetizar el efecto del anticuerpo

La cepa de una especie de micoplasma usada en la prueba puede influir sobre el título del anticuerpo ya que algunas cepas tienen una mayor capacidad para detectar anticuerpos en comparación con otras.

INHIBICION DE LA REDUCCION DE TETRAZOLIO. (21).

Una variación de la prueba de inhibición metabólica es la prueba de inhibición de la reducción de tetrazolio. Esta prueba se basa en que se ha observado que ciertos micoplasmas reducen el cloruro 2,3,5, trifeniltetrazolio acromático a "formazán" color rojo ladrillo. Esta propiedad se puede usar para demostrar la inhibición metabólica de los micoplasmas por medio de un anticuerpo específico. El procedimiento para realizar la prueba es similar al que se emplea en la prueba de inhibición metabólica, pero mide una propiedad diferente de los micoplasmas. La inhibición de la reducción de tetrazolio tendrá como resultado el que no haya cambio de color en el medio. El título de un suero de prueba es la dilución más alta del suero que evita un cambio de color, es decir, que inhibe completamente la reducción de tetrazolio a un precipitado rojo. Esta prueba es útil si un organismo es incapaz de emplear ya sea la arginina o la glucosa, pero puede reducir el tetrazolio. Si un micoplasma es glucolítico y también puede reducir al tetrazolio, los

títulos de inhibición con reducción de tetrazolio de los antisueros son similares a los obtenidos con la prueba de inhibición metabólica que usa la producción de ácido a partir de la glucosa como un sistema indicador. Por lo tanto, las dos pruebas son comparables con lo que respecta a su sensibilidad.

Las lecturas de la reducción de tetrazolio se realizan cuando los controles del micoplasma tienen un precipitado rojo.

INMUNOFLUORESCENCIA. (21)

La inmunofluorescencia es una prueba fácil, práctica, específica de especie y es altamente sensible. Se requiere de un microscopio equipado con un aditamento para la iluminación incidente. La identificación se puede hacer en unas cuantas horas. Es especialmente valioso en el caso de organismos que son difíciles de subcultivar a partir de placas de aislamiento. Se puede evaluar la pureza de los cultivos y se puede detectar fácilmente a los cultivos mixtos.

La tinción inmunofluorescente de las colonias, tanto el directo como el indirecto, son medios seguros que han probado que son valiosos para la identificación de micoplasmas. La decisión acerca de que técnica usar a menudo se va a determinar por la disponibilidad de los reactivos. La prueba directa requiere de un antisuero conjugado específico para cada micoplasma que se vaya a probar. La conjugación de grandes cantidades de antisueros puede requerir de mucho tiempo. La prueba indirecta a menudo requiere solamente de un reactivo conjugado, una globulina anticonejo, ya que la mayoría de los antisueros se producen en conejos. Estos conjugados y otros más dirigidos en contra de las globulinas de otras especies se encuentran disponibles comercialmente. Ambas pruebas son específicas, pero la prueba indirecta es más sensible y tiende a dar menos fluorescencia de fondo inespecífica que pudiera interferir con la interpretación de la prueba.

Antes de llevar a cabo la prueba se deben determinar las diluciones del antisuero y del conjugado con los que se va a trabajar. La dilución de globulina anticonejo con fluoresceína conjugada para la prueba indirecta esta determinada por la titulación del registro que usa un potente antisuero de conejo positivo. El punto final de meseta es la dilución más alta del suero y este título se usa para determinar la dilución óptima de otros antisueros. No es necesario que se tiña una placa completa de agar si el volumen de los reactivos es limitado. Se puede transferir los bloques de agar a los portaobjetos ó a los recipientes para microtitulación para realizar la coloración.

PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

En este método, los anticuerpos que van a reaccionar con un antígeno específico son por sí mismos antígenos que reaccionarían con un conjugado específico contra las inmunoglobulinas. Si un antisuero contra globulinas de conejo ha sido preparado en cabras se marca con fluoresceína, y será capaz de reaccionar con las inmunoglobulinas de conejo, aún si estas últimas están unidas a un antígeno. Por este mecanismo, el antígeno se detectará como fluorescente aunque el primer anticuerpo no este conjugado.(36).

PROCEDIMIENTO.

1. Se necesitan colonias pequeñas, que se encuentren separadas. En ocasiones, el uso de colonias grandes puede dar resultados equivocados.
2. A las placas listas para AF se les puede mantener en refrigeración de 2 a 4 semanas en cajas o bolsas de plástico para impedir que ocurra la desecación.
3. Corte tiras de agar de aproximadamente 5 mm². que contengan colonias y colóquelas en el portaobjetos. Coloque los bloques lo suficientemente separados unos a otros de manera que los sueros no puedan fluir juntos (reaccionar juntos).
4. Fije el agar al portaobjetos por medio de cuadrados inversos en una mezcla de parafina al 65% y de vaselina al 35 %. Se pueden colocar de 6 a 8 cuadrados sobre un portaobjetos (la cera no debe de estar a una altura mayor que la del agar).
5. Ponga una gota de amortiguador en cada cuadrado mientras prepara las diluciones del antisuero. Esto ayuda a rehidratar al agar de modo que los bloques no puedan absorber demasiado antisuero.
6. Prepare diluciones de antisuero con amortiguador (pH de 7.2 a 7.4). No use antisuero no diluido o a una proporción de 1/10, con este usted podría obtener falsos resultados negativos.
7. Retire el exceso de amortiguador que hay en la superficie de cada uno de los bloques, sin secar con papel la superficie superior.
8. Ponga una gota de antisuero diluido en cada uno de los bloques.
9. Incube a temperatura ambiente durante 30 minutos en una cámara húmeda.
10. Lave 2 veces durante 10 minutos con amortiguador de fosfato.
11. Retire el exceso de amortiguador de cada uno de los bloques.
12. Ponga una gota de globulina contra conejos de fluoresceína conjugada en cada bloque.
13. Predetermine la dilución de cada remesa de conjugados, generalmente de 1/20 o de 1/30 .
14. Incube a temperatura ambiente durante 30 minutos en una cámara húmeda.
15. Lave 2 veces durante 10 minutos con amortiguador de fosfato.
16. Lea con la ayuda de la iluminación epifluorescente.

Esta técnica le permite identificar a más de una especie cuando el cultivo es mixto (mezclado). Los bloques teñidos se pueden almacenar a 4-10 °C en una cámara húmeda durante varios días, si así lo desea.

PRECIPITACION DEL SUERO PARA AF INDIRECTA.

1. 5 ml de (NH₄)₂SO₄ saturado
2. 10 ml de suero; añádale lentamente, gota a gota, al (NH₄)₂SO₄ agitando constantemente; oscítelo toda la noche a 4°C.
3. Centrifugar a 6000 rpm, durante 10 minutos, a 4-10 °C
4. Resuspender el precipitado con 10 ml de agua destilada
5. Añádale a 5 ml de (NH₄)₂SO₄, como se indico anteriormente.
6. Agite durante una hora y media a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a 6000 rpm, durante 10 minutos, a 4-10 °C.
8. Resuspender en 3.3 ml de agua destilada.
9. Dializar durante toda la noche en solución salina.
10. Mida el volumen y con PBS vuelva al volumen original con un pH de 7.5, almacenando a -20 °C.

11. Uselo para el método de AF indirecta

El suero precipitado reduce la coloración de fondo en AF indirecta.

CONJUGACION DEL SUERO CON EL ISOTIOCIANATO DE FLUORESCINA. (FITC)

1. .Precipite la globulina por medio de una saturación de 1/3 con sulfato de amonio, por ejemplo, agregue gota a gota 10 ml de suero a 5 ml de sulfato de amonio saturado, agitando constantemente. Oscile toda la noche a 4°C.
2. Centrifuge a 6000 rpm, durante 10 minutos, a 4-10 °C.
3. Vuelva a disolver (redisuelve) el precipitado en agua destilada que tenga un volumen igual a 1/3 del que tenía el suero originalmente.
4. Dialice en contra de la solución salina a 4 °C, agitando. Cambie la solución salina 3 ó 4 veces durante el día y continúe la diálisis durante toda la noche.
5. Retírelo de la envoltura y mida el volumen.
6. Añada PBS, con un pH de 7.5, hasta alcanzar un volumen total que sea el doble del volumen original del suero.
7. Determine el contenido proteínico de la solución por medio del espectofotómetro a 280 nm.

D. O. X factor de dilución X 10 = mn de proteína / ml.

13.7

X Vol. = proteína total.

8. Prepare un amortiguador carbonato-bicarbonato que éste fresco.

0.5 M, pH 9.0

0.37 g de NaHCO₃ bicarbonato de sodio.

0.06 g de NaCO₃ carbonato de sodio.

Disuelva y haga que lleguen a ser 10 ml, con ayuda de agua destilada.

9. Añada el amortiguador carbonato-bicarbonato a la solución proteínica en una proporción de 1:1.
10. Pese el FITC de manera que sea una cantidad igual a 1/60 de la proteína total.
11. Disuelva el FITC en un volumen pequeño de amortiguador carbonato-bicarbonato.
12. Añádalo gota por gota, muy lentamente, a la solución de proteína que está sobre un agitador.
13. Deje que reaccione toda la noche a 4 °C, agitando constantemente, o 3 horas a temperatura ambiente.
14. Prepare una columna Sephadex G25 ó G50, de un diámetro de 12 mm.

Rellene a una altura de 3.5 cm / ml del suero que se va a emplear.

Balancee y active con el amortiguador Tris-HCl, 0.1 M, pH 8.7.

15. .Aplique la solución proteína -FITC a la columna.
16. Eluya con Tris-HCl, pH 8.7 y recolecte el primer valor máximo.
17. Aplique esta fracción a una columna DEAE-celulosa balanceada con amortiguador Tris-HCl.

18. Ajusta la tasa de flujo a 0.7-1.0 ml / minuto.

Eluya con Tris-HCl, 0.1 M, pH 8.7 y con Tris-HCl , 0.1 M, pH con 8.7 + 0.1 M de NaCl, y después con Tris-HCl , 0.1 M, pH 8.7 + 0.2 M de NaCl.

19. Concentre las fracciones si es necesario.

20. Conjugue la prueba con organismos homólogos.

21. Almacene en volúmenes pequeños en ampulas selladas a -70 °C.

Amortiguador Tris-HCl, 0.1 M, pH 8.7.:

- * Tris hidroximetilaminometano, peso molecular : 121.4.
- * Disuelva 48.46 g en agua destilada.
- * Haga que el volumen sea de 3990 ml.
- * Ajuste el pH pero que sea de 8.7, con ayuda de HCl.
- * El volumen final será de 4000 ml.

DERIVADOS DE LA FLUORESCENCIA. El isocianato de fluoresceína (ICF) y el isotiocianato de fluoresceína (FITC) son los únicos derivados de la fluoresceína que han sido empleado con éxito como marcadores de proteínas. La fluoresceína se conjuga mejor por medio de la sal isotiocianato. El compuesto puro, cristalino, resulta caro, pero proporciona mejores resultados. El isocianato se emplea muy raramente debido a su inestabilidad y a que su preparación requiere condiciones especiales. (36).

Deben de realizarse los cultivos con los controles positivo y negativo cuando se quiere identificar cultivos puros que nos sean desconocidos para así garantizar que los reactivos están trabajando apropiadamente. Las diluciones del conjugado con las que trabajamos tienden a dar una fluorescencia disminuida o atenuada después de múltiples ciclos de congelamiento / descongelamiento. Debe de incluirse un procedimiento de control para demostrar que la globulina anticonejo conjugada , por sí sola, no provoca ningún tipo de fluorescencia.(36).

CONTROLES DEL METODO INDIRECTO.

ANTIGENO	REACTIVO PARA EL PASO 1	REACTIVO PARA EL PASO 2
RESULTADOS		

	Ninguno o solución salina	Conjugado antiglobulinas.	No fluorescencia
	Suero normal	Conjugado antiglobulinas.	No fluorescencia
Homologo	Antisuero específico absorbido	Conjugado antiglobulinas	No fluorescencia
	Suero heterólogo	Conjugado antiglo-	No

		bulinas	fluorescencia
Heterólogo	Antisuero específico	Conjugado antiglobulinas heterólogo	No fluorescencia
	Antisuero específico	Conjugado antiglobulinas	No fluorescencia

Morilla. 1986

VENTAJAS DE ESTE METODO.

Obteniendo los conjugados anti-inmunoglobulinas de diferentes especies no es necesario conjugar inmunoglobulinas específicas contra diferentes antígenos.

Se aumenta la sensibilidad. Dado que la proporción de combinación molecular de un anticuerpo para un antígeno es casi siempre mayor de 1 y puede ser hasta 10, la capa intermedia de anticuerpos sin conjugar multiplica el número de sitios a los cuales los marcadores fluorescentes pueden unirse.(36).

PRUEBAS SEROLOGICAS

COLECCION DEL SUERO

Las muestras serológicas son de valor para establecer si los micoplasmas estuvieron involucrados en el proceso de la enfermedad en los casos en que los microorganismos ya desaparecieron de los tejidos, después de la fase aguda de la enfermedad. La serología es de valor únicamente en los casos en que se sospeche de una determinada especie y se tenga a la mano un antígeno específico (12).

Es conveniente hacer algunas recomendaciones prácticas acerca de la mejor forma de obtener la muestra de suero:(36).

Las aves deberán ser sangradas de acuerdo con la edad y dependiendo de si queremos que sigan viviendo o no. El éxito del sangrado depende, entre otras cosas, del uso de agujas nuevas que faciliten el asertar en la vena y de aspirar lentamente para evitar que la vena se colapse.

En pollitos de 1-28 días la muestra se obtiene fácilmente por decapitación. Pero si pretendemos que sobrevivan podemos obtener 1-2 ml de sangre, dependiendo de la edad, sangrándolos en la vena yugular con una aguja número 20 o 21.

De las 4 semanas en adelante podemos sangrar de la vena axial usando una aguja de la misma medida para obtener de 3-10 ml.

Aún en animales adultos es difícil obtener mayor cantidad de sangre, dada la velocidad de aspiración en esta vía.

Cuando se desea obtener más sangre y no importa la vida del animal, podemos sangrar directamente del corazón a través de la pared costal o por la entrada del pecho. Aun cuando un buen número de animales sobreviven, podemos esperar perder el 10-20%.

Colecte de 5-10 ml de sangre sin anticoagulante y colóquela en frascos limpios y estériles, evitando ejercer demasiada presión al vaciar la jeringa para evitar la hemólisis. Acomode los frascos en posición horizontal, hasta que la sangre coagule, luego desprenda el coágulo, deje el frasco a temperatura ambiente y refrigere durante toda la noche, separe el suero por decantación y descarte el coágulo.

En general se recomienda obtener los sueros en forma individual, evitando hacer mezclas, porque al hacerlo se diluyen los sueros mutuamente y un solo suero positivo en una mezcla de 5 o 10 puede convertir la prueba en positiva, enmascarándolo, por ejemplo, animales que no respondieron a una vacuna.

Realice recolecciones de suero a los 4 o 6 días de iniciado un problema, aparentemente infeccioso y recolecte suero durante la convalecencia de la enfermedad, de 3 a 4 semanas después de haber tomado la primera muestra. El número de sueros de la muestra dependerá de la contagiosidad del agente infeccioso, así, en el caso de micoplasmosis es preciso tomar muestras al 100% de las aves.

RESPUESTA DE LOS ANTICUERPOS ANTE EL MICOPLASMA

- La respuesta inicial se da por los anticuerpos IgM detectable a los 5-7 días pos-infección. Para determinar su presencia se utiliza la prueba de aglutinación en placa.(36,25,7).
- La respuesta de los anticuerpos de IgG es detectable a las 2-3 semanas pos-infección. Y es medible por la prueba de HI o ELISA.(25).

MANEJO DEL SUERO

- Para la prueba de aglutinación se requiere de suero fresco no congelado.(25).
- El suero para otras pruebas puede estar congelado.(25).
- Almacene a 4°C durante una semana.(25).
- Almacene indefinidamente a -20 °C ó a temperaturas más bajas.(25).

CONSIDERACIONES SOBRE LAS PRUEBAS.

Cuando se planea utilizar algunas prueba de diagnóstico serológica, para reconocer un agente, es recomendable analizar: (36).

Las características del agente.

La patogenia de la enfermedad.

La respuesta inmune que provoca.

Las pruebas serológicas son pruebas a la bandada.(20)

Se deben conocer características de las pruebas(sensibilidad, especificidad, clases de anticuerpos que reconocen, así como ventajas y desventajas).

Si no se aplican estos criterios, en muchos casos las pruebas pueden fallar o no tener la eficiencia necesaria.

AGLUTINACION EN PLACA

La aglomeración de bacterias por anticuerpos específicos en sangre completa o en suero es uno de los primeros procedimientos serológicos que fue aceptado para el control de las enfermedades aviares.(20).

La aglutinación se produce por la interacción entre un anticuerpo bivalente (IgG) y polivalente (IgM) y un antígeno sobre una superficie celular o sobre una partícula. En proporciones adecuadas, se produce un entrecruzamiento entre los determinantes antigénicos de partículas adyacentes que originan la aglutinación. La aglutinación se observa macroscopicamente con facilidad en forma de agregados gruesos o grumos.(9,25).

Muestra. Suero.

Material.

1. Biológico.

Antígeno;*Mycoplasma gallisepticum* nobelis. Este antígeno es una suspensión de gérmenes de *Mycoplasma gallisepticum* cepa S6 de Aldler, muertos y coloreados. El poder aglutinógeno ha sido definido con un suero patrón. (Laboratorio Intervet) (19).

Antígeno de *Mycoplasma synoviae nobilis*. Es una suspensión de gérmenes de *Mycoplasma synoviae*, cepa WVU-1853 (A.T.C.C.); muertos y coloreados (Laboratorio Intervet).(27).

2. De laboratorio. (25).

Placa de vidrio , cuadrículada de 4 cm por cada lado

Caja de iluminación, (encubadora).

Rotador múltiple.

Pipeta 1/ 100

Gotero , estandarizado para depositar 0.03 ml de antígeno.

Reloj marcador.

Toallas desechables y limpiadores.

Procedimiento.(36).

1. Poner los reactivos a temperatura ambiente.
2. Coloque 0.03 ml de suero en la placa de vidrio.
3. agregue 0.03 ml de antígeno teñido específico y mézclelo con el suero.
4. Con el removedor se agitan las mezclas de antígeno y suero en forma rotatorio durante 1-2 minutos.
1. Colocar la placa en la caja de iluminación y dar lectura.

Interpretación.

POSITIVO: Formación de grumos (aglutinación)(20,25).

NEGATIVO: Sin evidencia de aglutinación.(20,25).

Las reacciones positivas deben ser confirmadas por pruebas de HI. Se recomienda tener siempre controles positivos y negativos.(25,36).

VENTAJAS.

- Es una prueba muy sensible.(18,26).
- Puede detectar aves infectadas desde los 5-7 días después de la infección.(18).
- Es muy barata y fácil de desarrollar. (18).

DESVENTAJAS

La prueba puede tener reacciones falsas positivas debido a:

- Antígenos congelados.(18).

- Sueros congelados o contaminados. (18,23)..
- Infección por *Staphylococcus spp.*(18).
- Uso de vacunas inactivadas.
- Es común ver una mayor incidencia de reacciones falsas positivas a MS y MG hacia las 2 semanas después del uso de vacunas inactivadas, y que duran hasta 10 semanas. Algunas vacunas de emulsión aceitosa causan la mayor parte de resultados erróneos positivos (bacterina MS, bacterina de coriza, vacunas virales que crecen en un cultivo celular) ó cualquier producto que contenga componentes del suero.(18,23,25,42).
- MS y MG pueden temporalmente tener una reacción cruzada (es decir una reacción parcial o reconocimiento de un epítotope por medio de un anticuerpo, el cual se generó como respuesta a otro antígeno), por el hecho que comparten antígenos comunes.(18,23,25).
- No hay reacción cruzada con otros micoplasmas.(25).
- Para MS en pavos la aglutinación puede tener poca sensibilidad.(23,25).
- La prueba es baja en especificidad, por lo tanto debe usarse como prueba de tamiz.(18,23).

INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION. (25).

La hemoaglutinación puede ser inhibida por medio de anticuerpos específicos presentes en el suero utilizando antígenos conocidos. Aunque con esta prueba se determina solo anticuerpos circulantes y no es posible relacionar el título directamente con la protección, resulta de gran utilidad para saber si una parvada esta infectada o si ha reaccionado adecuadamente a la vacuna. (20).

Muestra. Suero

Material.

1. Biológico.

Antígeno de MS y MG (de acuerdo al protocolo de producción del antígeno en el laboratorio).

Suero control positivo y negativo (de acuerdo al protocolo de producción).

2. De laboratorio..

Solución amortiguadora de fosfato (PBS) con un PH de 7.2.

Placa de microtitulación con 96 pozos (fondo en u)

Pipeta de microdilución. (Para 50 µl)

Glóbulos rojos en PBS al .5 %. Use de la misma especie que se este trabajando.

Cinta adhesiva para sellar.

Cámara de fuente luminosa para leer.

TITULO DE HEMOAGLUTINACION DEL ANTIGENO. (25)

1. Coloque 50 μ l de PBS dentro de cada uno de los 96 pozos de las 3 filas de la microplaca.
2. Coloque 50 μ l de antígeno en el primer pozo de las 2 primeras filas.
3. Se hacen diluciones dobles (50 μ l) con la pipeta de microdilución. La dilución en serie va de 1:2 a 1:4096.
4. Añada 50 μ l de glóbulos rojos en cada pozo de las tres filas. La fila que no tiene antígeno servirá como control de los glóbulos rojos.
5. Incube a temperatura ambiente (aproximadamente 30 a 60 minutos) hasta que se forme el botón de glóbulos rojos del control.
6. El título de hemoaglutinación se lee en el último pozo que se ve completa la hemoaglutinación.
7. Diluya el antígeno a 4 unidades hemoaglutinantes para la prueba de inhibición de la hemoaglutinación. En la técnica de dilución del suero de HI se usa la mitad del volumen del antígeno - 25 μ l en vez de 50 μ l. La dilución requiere de 4 unidades HA en 25 μ l y se calcula dividiendo el título de HA del antígeno por 8

Ejemplo: 1:1280 unidades de HA /8 = 160 diluir el antígeno 1:60

En el ensayo de la técnica de dilución del antígeno de HI, se usa 50 μ l de antígeno. La dilución requiere de 4 unidades HA en 50 μ l; se calcula dividiendo el título de HA por 4.

Ejemplo: 1:1280 unidades HA/4 = 320, diluir el antígeno 1:320

PRUEBA DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION. (25)

Hay dos técnicas que se pueden usar en el marco de ensayo de HI. Una técnica incluye la dilución seriada del suero antes de adicionar el antígeno apropiado (técnica de dilución del suero).

La segunda técnica del ensayo incluye la dilución de la muestra de suero en suero salino conteniendo el antígeno (técnica de dilución del antígeno).

TECNICA DE DILUCIÓN DEL SUERO. (25)

1. Etiquete una columna de A-H, de los 96 pozos de la placa de microtitulación en fondo en U para cada muestra, cada control positivo y negativo del suero, antígeno de respaldo titulado y control de glóbulos rojos.
2. Adicione 40 μ l de PBS en los pozos de la fila A de la placa.
3. Adicione 25 μ l de PBS en todos los restantes pozos de la placa.
4. adicione 10 μ l de cada prueba de suero a los pozos A de cada columna (preparar la dilución de suero 1:5).
5. Hacer diluciones seriadas de 25 μ l del pozo A hasta el H usando la micropipeta. Descartar al final 25 μ l. Fila A =1:5....fila H 1:640.
6. Adicionar 25 μ l de antígeno con 4 unidades HA del pozo B hasta el H. Donde el pozo A servirá como control del suero.

7. Prepare un antígeno de respaldo (antígeno control) por la adición de PBS a cada pozo de una columna. Adicione 25 μ l de antígeno diluido al pozo A y haga diluciones seriadas del pozo A-D. Se prepara la dilución 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16. Se recomienda que el antígeno control se haga antes de diluir en antígeno que es usado en el ensayo. Los problemas de dilución pueden detectarse y corregirse antes de una dilución inapropiada del antígeno y el desempeño de un ensayo inválido.
8. Dejar una columna de pozos de respaldo para el control de glóbulos rojos. (PBS más glóbulos rojos, no antígeno)
9. Agite suavemente e incube por 30 minutos a temperatura ambiente.
10. Adicionar 50 μ l de glóbulos rojos al 0.5 % a todos los pozos.
11. NOTA: No agite después de haber agregado los glóbulos rojos. (la agitación puede resultar en falso positivo por causar que los glóbulos rojos se revoten dentro de los pozos, resultando botones falsos).
12. Sellar la placa con cinta adhesiva. Incubar a temperatura ambiente aproximadamente 60 minutos, hasta que el control de glóbulos rojos forme un botón apretado.
13. Leer la reacción en la caja de fuente luminosa.

Resultados.

El título se reporta como el recíproco de la última dilución donde se formo un botón apretado de los glóbulos rojos. El proyecto de dilución final incluye el calculo de la dilución del antígeno: B = 1:20, C = 1:40, D = 1:80, E = 1:160, F = 1:320, G = 1:640, H = 1:1280.

Para que el ensayo se considere valido debe encontrarse lo siguiente:

El control positivo del suero debe de dar un resultado dentro de una dilución y previamente determinar su título.

El control negativo del suero debe ser negativo.

El antígeno de respaldo debe dar un título de 1:4 o 1:8.

El control de glóbulos rojos debe dar botones apretados, no hemolizados.

Sueros control (pozos A de cada prueba de suero) no debe tener aglutinación inespecifica o hemólisis. Si es negativa, informe como negativo con aglutinación inespecifica o hemólisis o incapaz de evaluar debido aglutinación inespecifica o hemólisis.

TECNICA DE LA DILUCION DEL ANTIGENO . (25)

1. Etiquetar una columna (A-H) de los 96 pozos de la placa de microtitulación para cada muestra, control de suero positivo y negativo, antígeno de respaldo y control de glóbulos rojos.
2. Adicionar 100 μ l de PBS a los pozos de la fila A de la placa.
3. Adicionar 10 μ l de cada prueba de suero a los pozos A de cada columna (preparar dilución del suero de 1:10).
4. Hacer 4 y 8 unidades de HA del antígeno de acuerdo a los resultados de la prueba de HA.
5. En los pozos de la segunda fila adicionar 50 μ l de 8 unidades de HA del antígeno.
6. En los restantes pozos adicionar 50 μ l 4 unidades HA del antígeno.
7. Hacer diluciones seriadas de 50 μ l del pozo A hasta el H. Descartar al final 50 μ l. Fila A= suero control (no antígeno).

8. Preparé un antígeno de respaldo por la adición de 50 μ l de PBS a cada pozo de una columna. Adicione 50 μ l de antígeno diluido al pozo A y haga diluciones seriadas del pozo A-D: 1:2, 1:4, 1:8, Y 1:16. Se recomienda que el antígeno control de respaldo se haga antes de diluir el antígeno que se utilizará en el ensayo. Los problemas de dilución pueden detectarse y corregirse antes de una dilución inapropiada del antígeno y el desempeño de un ensayo inválido).
9. Dejar una columna de pozos de respaldo para el control de glóbulos rojos (50 μ l de buffer más 50 μ l de glóbulos rojos en suspensión al 0.5%, no antígeno).
10. Adicionar 50 μ l de glóbulos rojos en suspensión al 0.5% a cada pozo. Mezclar suavemente
11. Sellar la placa con cinta adhesiva. Incubar a temperatura ambiente menos de una hora. (hasta que se forme el botón apretado del control de glóbulos rojos).
12. leer la prueba. En casos donde se dificulte la determinación del punto final (completa la inhibición de la hemoaglutinación) inclinar la placa y observar si el botón de glóbulos rojos se corre como una lagrima como en el botón del suero control. Si esto ocurre, esta es una reacción positiva y en la reacción negativa no se formará una lagrima

Un control de células es necesario para asegurar que los glóbulos rojos que se usaron no contengan nada que pueda ocasionar HA. El control de células ninguna deberá mostrar HA.

Suero control. El primer pozo de cada muestra de suero no contendrá antígeno y no habrá HA en este pozo.

NOTA. Algunos lotes de antígeno de HA dan una reacción de campo, esto es, suero negativo puede dar la apariencia de reacción con un título de 1:20 o 1:40 o un nivel más alto. En un parecido examen se notará la inhibición de la hemoaglutinación no completa; esto es, el contorno del botón de células puede no estar completamente claro, el borde de el botón puede no estar liso y entero, y el botón no se correrá cuando se golpee ligeramente la placa. Para tal reacción puede ser necesario el incremento de la concentración de el antígeno de HA, invariable en exceso de 4 unidades. La concentración de antígeno deberá ser lo bastante fuerte para suprimir cualquier tendencia de una reacción negativa del suero. Este eliminará falsos positivos. Si se incrementa la concentración de antígeno decrece la sensibilidad de la prueba de HI; si decrece la concentración de antígeno incrementa la sensibilidad.

Interpretación.

Menor de 1:20, negativo.

1:20 hasta 1:40 sospechoso.

Mayor o igual 1:80, positivo.

Los valores anteriores no son absolutos, los resultados deben evaluarse en base a una bandada.

Causas de la variabilidad de los resultados:

- La fuente del antígeno.
- Las variaciones que hay entre los laboratorios
- Variabilidad en la remesa de antígenos.
- La resistencia del antígeno ; así como su concentración.
- La interpretación de los puntos finales.

- Variación antagónica.
- La fuente de RBC (recuento de glóbulos rojos).

VENTAJAS

- Es realmente barata y rápida.(20,25).
- Es muy específica, produce muy pocos falsos positivos (18).

DESVENTAJAS

- Puede haber una respuesta tardía (de 3 semanas ó más).(25).
- Es menos sensible que la aglutinación en placa.(25).
- El antígeno no se encuentra disponible comercialmente, lo que limita severamente al número de laboratorios que desarrolla la prueba.(23,25).
- La prueba también esta sujeta en buena parte a la interpretación, de modo que los resultados pueden variar de un laboratorio a otro(18,23,25).

Esta prueba se utiliza ya que a pesar que no representa la inmunidad total, si es buen indicador de la resistencia del ave y es de aceptación general entre los MVZ de campo y los laboratoristas de diagnóstico. (20).

PREPARACION DE GLOBULOS ROJOS AL 0.5 % EN PBS PARA LA PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION. (25).

Preparar glóbulos rojos de pavo o de pollo para la prueba de HA.

Material

Sangre de pavo o de pollo.
 Solución amortiguadora de fosfato (PBS)
 Jeringa de 12 cm.
 Aguja hipodérmica del 21X 1.5 *
 Heparina .
 Centrifuga.
 Tubos de centrifuga de 50 ml.
 Pipeta de 1 ml.

El proceso de la colección de sangre deberá hacerlo en animales sanos.

PROCEDIMIENTO.

1. Carge en una jeringa de 12 cm con aguja hipodérmica del 21 por 1.5" un cm de heparina.
2. Pavo ó pollo; colecte 10 cm de sangre por venopunción de la vena del ala.
3. Para lavar la sangre colóquela en un tubo cónico de centrifuga de 50 cm con 40 cm de PBS. Invertir suavemente la mezcla varias veces.
4. Centrifugar por 10 minutos a 1200 rpm.
5. Vaciar el PBS y se repetirán los pasos (tres lavados).

6. Almacenar el PBS a 4 grados centígrados hasta que se use. Los gióbulos rojos se pueden utilizar durante 5 días y se descartarán los hemolisados o contaminados
7. Pipetear 0.5 ml del paquete de células dentro de 100 ml de PBS.
8. Revolver suavemente la suspensión.

PRODUCCION DE ANTIGENOS DE MICOPLASMA. (25).

1. Para la prueba de aglutinación en placa o para la prueba de HI, se puede usar un medio preparado con suero de cerdo; sin embargo, los antígenos preparados a partir de un medio con liposomas artificiales, tienen una especificidad aún mayor.
2. Después que el medio ha sido preparado y esterilizado por filtración, se le coloca en tres recipientes estériles, en donde cada recipiente sucesivo contiene aproximadamente 10 X del volumen del recipiente precedente.
3. Una parte del medio debe de ser colocado en tubos, de manera que el cultivo que se va a usar pueda sembrarse.
4. Después de que el cultivo se ha desarrollado (24 horas), se puede inocular al primero de los tres recipientes. La cantidad del inóculo es de aproximadamente 1/10 (v/v).
5. Incube a 37 °C y debe de pasar el contenido del primer recipiente dentro del segundo y del segundo dentro del tercero en intervalos de 24 horas. El pH del último recipiente no debe de estar por debajo de 6.0 antes de la recolección (en decir , la obtención o separación de bacterias u otros organismos de un cultivo), siendo preferible el pH de 6.5.
6. A los organismos se les puede recolectar por medio de una centrifuga de flujo continuo. Centrifuge durante 30 minutos a 12000 x g. (equivalente aproximadamente 9000 rpm en un rotor Sorvall GSA)
7. Hágalo girar, vacíelo, llénelo y hágalo girar de nuevo hasta que se haya recolectado todo el cultivo.
8. Ahora es posible recolectar la píldora resultante.

ANTIGENO PARA AGLUTINACION. (25).

1. Se tritura la píldora usando un triturador de tejidos "Ten Broeck", en un amortiguador de fosfato fenolizado (pH de 6.0).
2. Este antígeno puede ser estandarizado por medio de volumen de células concentradas (hematocrito) ó por medio del uso de un colorímetro con una D. O de 540 nm. Con el colorímetro usted necesita una dilución de 1:20 del material triturado y se deberá leer a una transmitancia de 73 % -76%.
3. El método que resulta más preciso para realizar la estandarización es el de ajustar el volumen a un hematócrito al 1% por medio de usar un tubo de Hopkins para centrifugar el antígeno a 1500 x g durante 90 minutos (equivalente alrededor de 2000 rpm en un rotor horizontal del tipo Internacional IECM modelo 221.
4. Agregue un 1 ml de rosa de Bengala al 1 % por cada 100 ml del antígeno (concentración final 1:10,000).
5. Almacene a 4 °C, no congele.
6. Para *M. synoviae* use un amortiguador de fosfato fenolizado con un pH de 7.0.

ANTIGENO PARA HI. (25).

1. La pildora se tritura como se indico anteriormente, y se le resuspende en un amortiguador (solución salina amortiguadora ó estabilizadora de fosfato, con un pH de 7.0-7.2)
2. Se añade un volumen igual de glicerol y se mezcla bien
3. La cantidad de amortiguador a usar debe ser de tal manera que el antígeno pueda tener suficiente título o cantidad de HA; por regla general, el volumen será de menos del 1% del volumen original del cultivo en caldo.
4. Haga un HA sobre el material triturado para determinar la actividad de HA (1 unidad = mayor dilución en la prueba de HA que de una hemoaglutinación completa)
5. El antígeno HA debe de mantenerse congelada en pequeñas alícuotas (3-5 ml) a -70 °C.

ANALISIS DE LA ENZIMA LIGADA A UN INMUNOABSORBENTE INERTE. ELISA.

Esta prueba se fundamenta en que el anticuerpo o el antígeno primero se fija a un soporte inerte y luego se hace reaccionar con el antígeno o anticuerpo correspondiente, que estará marcado con una enzima (conjugado); se lava el conjugado que no reaccionó y se mide la capacidad de hidrólisis de la enzima sobre su correspondiente sustrato. El resultado final es el cambio de color del sustrato incoloro de la enzima, a un producto coloreado, el cual se puede observar a simple vista o medirse en un espectrofotómetro para determinar la densidad óptica.(28,36).

El antígeno es fijado o inmobilizado en un soporte de fase sólida, se incuba con el suero que contiene el anticuerpo, se lava y se añade el conjugado, que consiste en antiinmunoglobulina conjugada con la enzima, de tal manera que reaccione con el anticuerpo del complejo antígeno- anticuerpo primario; se lava y se adiciona el sustrato; la cantidad de conjugado que se unió al primer anticuerpo se mide por la cantidad de sustrato degradado.(28,36).

Preparación de reactivos.

1. Diluir 5 µl de suero dentro de 250 µl de PBS..
2. Diluir el suero positivo y negativo 10 µl en 1 ml de PBS.
3. Diluir la solución de lavado. 20 ml en 380 ml de agua destilada (400 ml por placa)
4. Diluir el conjugado. 100 µl en 10 ml de PBS. (10 ml por placa).
5. La solución de sustrato no se diluye.
6. Diluir solución stop. 3 ml en 12 ml de agua destilada.

PROCEDIMIENTO.

1. Adicionar 50 µl de PBS en cada pozo. (A4 a H9).
2. Adicionar 100 µl de suero control normal diluido (negativo) a A2, H10, H12.
3. Adicionar 100 µl de suero control positivo diluido (positivo) a A1, A3, H11.
4. Adicionar 50 µl de suero diluido a los pozos correspondientes.

5. Incubar la placa por 30 minutos a temperatura ambiente
6. Lavar la placa tres veces, dejar que la placa se moje por 3 minutos en cada lavado.
7. Adicionar 100 μ l de conjugado diluido en cada pozo.
8. Incubar la placa por 30 minutos a temperatura ambiente.
9. Lavar la placa tres veces, dejar que la placa se moje por 3 minutos en cada lavado.
10. Adicionar 100 μ l de solución de sustrato en cada pozo.
11. Incubar la placa por 15 minutos a temperatura ambiente.
12. Adicionar 100 μ l de solución stop dentro de cada pozo. (usar la dilución stop).
13. Se sugiere flamear la placa para evitar burbujas que nos darán lecturas falsas.
14. Leer y guardar. (25)

CONJUGADO. Anticuerpos IgG de pollo producido en cabras más la enzima.
SUSTRATO. Anticuerpos con peroxidasa.

El conjugado, el sustrato y la solución stop se encuentran en el kit de la prueba.

ANTIGENO. El antígeno que se usa para ELISA puede ser soluble o insoluble, y se recomienda lo más puro posible para evitar resultados falsos positivos.(36).

FASE SOLIDA. Los soportes a los cuales se le va a unir el antígeno que han sido seleccionados son varios tales : partículas de celulosa , poliacrilamida, dextrán de unión, silicón, goma y plástico. En la actualidad el material más comúnmente utilizado es el poliestereno, que permite una fácil separación del material libre del complejo antígeno-anticuerpo.(36).

CONJUGADO. Antes de utilizar el conjugado en la prueba de ELISA se deberá establecer la dilución óptima para la reacción, la cual se logra por titulación del conjugado.(36).

SUSTRATO. El principal requerimiento para el sustrato es que ofrezca un método sensible de detección para la enzima en el conjugado.(36).

INTERPRETACIÓN..

La intensidad de la reacción esta directamente relacionada con la cantidad de conjugado de enzima y esto a la vez se determina por la cantidad de anticuerpos específicos en la muestra de suero.(28)

El anticuerpo en el suero de prueba se cuantifica por referencia con la densidad óptica de suero de control negativo y positivo. El estado inmune de la parvada puede determinarse evaluando la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los valores de título individuales. (28)

Los datos obtenidos de la prueba de ELISA pueden interpretarse como el nivel de inmunidad de la parvada y los títulos de muestras individuales pueden presentarse en una forma numérica en tablas para una evaluación visual rápida de las parvadas. (28)

Cuando los resultados de ELISA se basan en algunas diluciones o títulos, el punto final puede leerse visualmente.

0.0 —0.250	Negativo.
.251— .500	Sospechoso.
.500— . más	Positivo,

RECOMENDACIONES.

Aunque el sistema es simple de establecer, el gran número de pasos de la prueba hace necesario eliminar cualquier causa de error que pueda dar baja sensibilidad, especificidad y precisión. Se deben tomar en cuenta variaciones por: (36).

ABSORCION AL SOPORTE.

Las propiedades de fijación del antígeno.
La adsorción de proteínas inespecíficas.
Uniformidad del material .
Variación entre placas.

ANTIGENO.

Fuente de antígeno.
Concentración de antígeno (se establece por titulación).

ANTICUERPO.

Especie animal de la que proviene el anticuerpo.
Método de preparación.
Concentración de anticuerpo en la solución.
Tiempo de incubación.

MUESTRA.

Optima dilución.
Tiempo y temperatura de incubación.
Adsorción inespecífica al soporte.
Adición de proteínas que modifiquen a las enzimas.

CONJUGADO.

Estabilidad del conjugado.
Grado de heterogenicidad del conjugado.
Preparación del conjugado.
Dilución.
Tiempo de incubación.

SUSTRATO.

Tiempo de incubación.
Concentración..

ELISA tiene un campo muy amplio para ser utilizado en la investigación, el diagnóstico y en la terapéutica médica; sin embargo, es necesario conocer que tipo de análisis es el más acorde con las necesidades de lo que se quiere cuantificar, cual va a ser el uso potencial que se le puede dar y establecer el criterio para que su uso sea más

útil que otro método previamente establecido; esto es, si el método anterior no brinda la posibilidad de determinar animales positivos o portadores con bajos títulos de anticuerpos, se puede usar ELISA como una alternativa para ésta evaluación y no pretender usar un método sofisticado para enfermedades que se reconocen por otras pruebas que resultan más fáciles de establecer y más baratas.(36).

PRUEBA MOLECULAR

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA. PCR. (53).

Resulta fundamental que uno siga y respete las normas de seguridad durante las prácticas de laboratorio, lo que incluye usar la ropa adecuada para trabajar en un laboratorio así como utilizar guantes de plástico ya que muchas de las sustancias químicas que se emplean dentro del campo de la biología molecular son tóxicas y potencialmente mutagénicas.

En la última década se han producido avances importantes en las técnicas moleculares de ampliación de ácidos nucleicos (DNA y RNA). La técnica de mayor repercusión y excelentes ventajas para su aplicación como herramienta de diagnóstico en laboratorios clínicos, es la técnica de la reacción de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) (45).

Básicamente, la reacción consiste en el reconocimiento y la amplificación repetitiva de un segmento de DNA mediante sondas de nucleótidos. Dichas sondas, una vez hidrolizadas al DNA en estudio, sirven como matrices para la producción de nuevas cadenas de DNA mediante la acción de la enzima polimerasa. Los resultados de la reacción son visualizados a través de un simple proceso de electroforesis en gel. (24,45).

Este es un método para sintetizar grandes cantidades de un segmento de ADN comenzando desde cantidades mínimas de menos de 1 mg. Este método amplifica exponencialmente una secuencia de ADN objetivo de doble cadena que se ha insertado entre los activadores de los oligonucleótidos (un activador es un segmento corto de RNA que es el punto de partida para la síntesis de una hebra retardada o antiparalela de DNA en la duplicación de dicho DNA), a través de múltiples ciclos de amplificación; este paso se realiza a altas temperaturas, lo que inactiva a la polimerasa del DNA, por lo que es necesario añadir esta enzima al comenzar cada ciclo sintético (amplificación); este método permite la síntesis de millones de copias de un segmento de DNA que nos interesa dentro de un lapso de entre 6 y 8 horas.

PROCEDIMIENTO.

El método PCR implica la ampliación enzimática del ADN objetivo que es flanqueado por dos activadores de oligonucleótidos que hidrilizan a la hebra opuesta de la secuencia objetivo. Se orienta a los activadores dirigiendo a sus extremos de 3' uno hacia el otro y la reacción procede del extremo del 5' al de 3'. Los repetidos ciclos de desnaturalización por calor que sufre el molde o modelo (ADN objetivo), el recocido o ablandado de los activadores de sus secuencias complementarias y la extensión de los activadores recocidos o ablandados con la polimerasa de ADN termoacuática trae como resultado la amplificación del ADN objetivo (32). Por lo general, la reacción del PCR se realiza en un termociclador en donde las temperaturas para la desnaturalización, el recocido y la extensión se pueden controlar cuidadosamente. Después de aproximadamente 35 ciclos se puede amplificar el ADN objetivo un millón de veces. La PCR para micoplasmas aviarios son de 1000 hasta 10,000 más sensibles que la hibridación de las manchas o motas de la membrana en la que se usan registradores de

ADN. La especificidad del PCR se puede ver influida por la elección de los registradores, y por condiciones propias del PCR, tales como la temperatura de recocido o ablandado, la cual puede borrar de un sistema a otro.

FUENTES DE REGISTRADORES. Los registradores se pueden seleccionar a partir de la región del genoma que es única y particular de la especie en cuestión o a partir de la información que hay acerca de las secuencias únicas y particulares que estén en el gen del RNA ribosómico. Se han utilizado ambas técnicas en los micoplasmas aviares. En ambos casos es necesario tener información acerca de la secuencia del DNA objetivo que se va a amplificar a partir del cual se puede sintetizar los activadores. Se encuentran disponibles programas de computadora que pueden determinar cual es la mejor secuencia del activador que hay que elegir. Por lo general son de 20 a 25 bases de longitud, y son lo suficientemente largos como para servir inclusive como registradores de DNA. Las PCR para los micoplasmas aviares patógenos producen DNA objetivo amplificado (amplicons) que fluctúan entre los 200 y los 1000 pares de bases.

PROTOCOLO PARA LA EXTRACCION DEL DNA.

Hay varios procedimientos para la extracción del DNA de especímenes clínicos para uso en el PCR. El DNA no necesita estar químicamente puro para ser amplificado. Se puede usar preparaciones crudas de DNA que no contengan sustancias inhibitorias de la polimerasa, con excelentes resultados. Un procedimiento sencillo para la extracción del DNA, consiste en hervir las muestras por un período de 10 a 15 minutos; así, se lisan las células para liberar el genoma a la vez que se inhiben las enzimas citoplasmáticas que pueden degradar el DNA. La extracción del DNA se puede realizar también mediante el uso de detergentes aniónicos (Tritón 100, Tween 20), detergentes iónicos (sulfato de sodio duodecil) o proteinasa K. Los detergentes aniónicos no inhiben el PCR cuando se usan concentraciones menores al 5 %. Los detergentes iónicos y la proteinasa K, por el contrario deben ser removidos completamente de las muestras debido a que inhiben a la DNA polimerasa. Estas sustancias se pueden separar mediante el agregado de fenol y centrifugación posterior. El DNA se recupera en la fracción acuosa y se purifica de trazas de fenol (compuesto que también inhibe el PCR) mediante el uso de cloroformo/etanol. Una forma rápida de inactivar la proteinasa K es el calentado de la muestra a temperatura de 94-95 ° C por 3-5 minutos. Los diferentes protocolos para la extracción de DNA se ajustan de acuerdo a las necesidades. (45).

PREPARACION DE LA MUESTRA.

1. A la muestra clínica (exudado sinusal) se le mezcla en una proporción de 1:1 con esputolisina (5 mM de ditiotreitol, en 1 X de amortiguador para PCR (0.1 de Tris, 0.05 M KCL, pH de 8.3) para disolver el exudado.
2. Se agregan 3 µl de muestra tratada a un tubo de microcentrifuga de 0.5 ml que contiene 17 µl de desencadenante genético.
3. Después a la muestra se le cubre con 3 gotas de aceite mineral (para prevenir la evaporación) y se le calienta en el termociclador, según en tiempo y la temperatura que haya recomendado el proveedor del desencadenador genético.(45) El propósito de este reactivo es el de liberar y aislar el DNA del micoplasma.

ADICION DEL REACTIVO DEL PCR A LA MUESTRA.

- Después se añaden los reactivos del PCR (en μ l)
 Agua destilada 59
 10X de amortiguador termoacuático con iones de Mg (15 mM) *
 10 mM de cada nucleótido combinados en igual proporción ** 4.0
 SSB *** 1.0
 Activadores combinados , 6.0 (cada 100 ng/ μ l)
 Polimerasa termoacuática de DNA , 0.6 (2 unidades/0.5 μ l)

* (Promega corp., Madison,WI)

** Pharmacia Inc., Piscataway,NJ.

*** United Biochemical Corp., Cleveland, OH; SSB :es una proteína que porta DNA de una sola hebra y que mejora la especificidad de la prueba

Dependiendo del número de muestras, a todos los reactivos se les puede mezclar en un solo tubo al añadirlos al tubo de muestra . Para hacer más transferencias, se deben usar extremos con grifo (ápices tapados)

AMPLIFICACION DEL DNA OBJETIVO.

1. Se programa el termociclador para que se haga la amplificación del DNA objetivo: inicialmente se calienta la muestra a 95°C durante 2-5 minutos; a esto le siguen 35 ciclos de 3 segmentos temperatura/tiempo para cada ciclo (95/1, 55/2 y 72/1, los cuales corresponden a la desnaturalización del DNA objetivo, el recocido del activador , así como la extensión del activador).

Después que se han aplicado la temperatura y tiempos finales de calentamiento, que fueron de 72 °C durante 5 minutos , la muestra ya se encuentra lista para verificar si hubo la amplificación del DNA objetivo. El tiempo total para lograr la amplificación es de alrededor de 4.5 horas.

DETECCION DEL PRODUCTO AMPLIFICADO.

1.ELECTROFORESIS CON GEL DE AGAR (AGAROSE).

PROCEDIMIENTO.

- Un gel al 1% en 1 X gr amortiguador TAE se vierte en la cámara de gel para electroforesis. El 1 X de amortiguador TAE se prepara a partir de una reserva de 50 X de TAE (24.2 de base de Tris; 57.1 ml de ácido acético glacial; 100 ml de 0.5 M de EDTA, cantidad suficiente de agua destilada para 1 litro; pH=8.0). El gel se coloca en el aparato de electroforesis y a las cámaras se les llena con 1 X de amortiguador TAE para cubrir el gel. Se mezclan 10 μ l de muestra con 1 μ l de colorante rastreador (a partir de solución de reserva al 0.25% de azul de bromofenol) y se aplica al gel. Se emite una corriente de 100 mA (70 v) hasta que el colorante rastreador migre aproximadamente 2 pulgadas (5 centímetros) a partir del punto de origen (alrededor de 2 horas para un gel que lleva 30 muestras).
- Después al gel se le coloca en una solución de bromuro de etidio (añada 20 μ l de solución de reserva (10mg/ml) a 200 ml de agua destilada durante 5 minutos para

teñir al DNA; lavarlo y examinarlo bajo la luz ultravioleta para buscar una banda en un sitio específico sobre el gel, predeterminado por los activadores en particular que se utilizaron. En el caso PCR para MG, se utilizaron un par de activadores que amplificaron un DNA objetivo de 481 pares de bases (bp)

3. Los marcadores normales de peso molecular del DNA se incluyen en el gel para que ayuden a la identificación del producto amplificado. Se incluyen en cada prueba los controles positivo y negativo..

2. El procedimiento citado ha dado resultados satisfactorios con los exudados sinusales pero no han tenido resultado muy buenos o consistentes en las muestras de tráquea puestas en una torunda. En éste último caso, el siguiente procedimiento ha dado resultados positivos con las muestras de MG. Las torundas con muestra de la tráquea se mezclan perfectamente en 0.5 ml de caldo de cultivo, 100 μ l son retirados y sedimentados por centrifugación. El sedimento es resuspendido en 10 μ l de caldo de cultivo y se le trata con 10 μ l de mezcla de detergente no iónico (Nonidet P 40 "SIGMA", 0.45 %, Y Tween 20 "SIGMA", 0.45 %) Y 1 ml de una solución (10 mg/ml) de proteinasa K (SIGMA). Se calienta la muestra a 56 °C durante una hora y a 100 °C durante 10 minutos. Después de la centrifugación para establecer la condensación a un lado del tubo, la muestra ya está lista para su uso en el PCR.

Scheeper, de Sudáfrica, nos indica que pudo obtener resultados positivos del método del PCR para MG a partir de muestras de tráquea por medio del uso de un sistema de detección más sensible que los productos amplificados por la técnica de PCR (comunicación personal). A este procedimiento se le describe a continuación como el método número 3.

3. METODOS EMPLEADOS PARA DETECTAR PRODUCTOS AMPLIFICADOS POR LA TECNICA DEL PCR.

1. Se examinan los genes teñidos con bromuro de etidio bajo la luz ultravioleta para buscar las bandas de ADN (el procedimiento usado antes).

2. Se transfiere el DNA separado por electrofóresis con gel de (agarose) a una membrana sólida (membrana de Southern) y se le examina para buscar los productos originados por el PCR usando un registrador interno (un registrador interno es una secuencia de DNA dentro del amplicón, pero no incluye la secuencia del activador que flanquea a cada lado el amplicón). Sin embargo en algunos casos, el registrador ha incluido a las secuencias del activador que flanquea.

3. Se aplica el producto amplificado directamente sobre la membrana de nylon o de nitrocelulosa y se le examina con el registrador interno (es decir el análisis de las "manchas" de la membrana).

Para los procedimientos 2 y 3, el registrador debe ser marcado con un marcador isotópico o con un no isotópico, prefiriéndose éste último.

Los equipos que usan marcadores no isotópicos que emplean la quimiluminiscencia o el método colorimétrico de detección se encuentran disponibles en muchos sitios especializados. Recientemente se ha hecho la descripción de un método rápido para la detección de los productos surgidos de la técnica del PCR en recipientes para microemplacado.

Los equipos comerciales para la técnica de PCR en MS y MG usan los tres métodos citados. La presencia de un producto amplificado específicamente se detecta coloriméricamente con un registrador que está en conjunción con un marcador no isotópico.

VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL METODO DEL PCR

La principal ventaja que tiene el PCR sobre otras pruebas es la detección rápida y específica de ácidos nucleicos de una muestra. El procedimiento reduce el tiempo necesario para el diagnóstico de microorganismos, especialmente en los de crecimiento lento, y permite el seguimiento epidemiológico de patógenos en forma más eficiente. Las variaciones de la técnica tradicional del PCR han permitido el desarrollo de métodos como el PCR in situ, que detecta la presencia de ácidos nucleicos en muestras de tejidos embebidos en parafina.(45) La PCR además de ser muy específica es también una prueba muy sensible, por lo que nos sirve para detectar cepas atípicas de micoplasmas que presenten resultados serológicos negativos, así mismo nos permite la detección de infecciones tempranas en las que todavía no existe respuesta humoral. Por el alto grado de especificidad de la PCR, no se considera que puedan existir problemas de resultados de falsos positivos, pero hay que tener cuidado para evitar contaminaciones con fragmentos de DNA y hasta micoplasmas muertos que puedan estar presentes en el laboratorio. Se han revisado los métodos para reducir la contaminación (por ejemplo: el que haya un compromiso de que se deben de mantener las áreas limpias, el uso de procedimientos rígidos a la hora de preparar los reactivos para el PCR, el tratamiento periódico de las pipetas con luz ultravioleta para destruir el DNA extraño, el uso de pipetas especiales y de extremos con grifo (ápices tapados), y el tratamiento de los productos surgidos del PCR con diversas sustancias químicas para hacerlos no reactivos).

El PCR puede ser utilizado para confirmar las reacciones serológicas y tiene inclusive el potencial para reemplazar el cultivo de los micoplasmas como prueba confirmatoria del diagnóstico.(41) En estudios recientes, se encontró que ni la prueba de aglutinación en placa ni la HI detectaron las infecciones tempranas en los lotes infectados con MS, mientras que la PCR y Elisa si detectaron dichas infecciones, por lo que se recomienda el uso de Elisa como prueba serológica primaria y la PCR como prueba confirmatoria (42)..

A pesar de la alta sensibilidad y especificidad de técnicas moleculares de diagnóstico, el costo y el entrenamiento de personal serán los principales factores limitantes para adoptar estas técnicas en laboratorios o centros de diagnóstico.(49).

AVANCES RECIENTES DENTRO DE LA TECNICA DEL PCR

Actualmente se encuentran disponibles termocicladores capaces de completar 30 ciclos de la reacción dentro de un lapso de 10 y 15 minutos, termocicladores que aceptan ya sea tubos o microplacas y termocicladores que no requieren que se les añada aceite mineral a los tubos. Los termocicladores que cambian con rapidez y precisión de una temperatura a otra, perfeccionarán en gran medida las reacciones propias del método del PCR.

MEMBRANA DE SOUTHERN. Es una técnica para identificar la presencia o ausencia de un segmento de DNA en una muestra; el procedimiento comienza en la digestión enzimática parcial de los ácidos nucleicos, cortando al DNA en sitios específicos por medio de una endonucleasa reactiva, la cual reconoce y corta en secuencias de 5-6 nucleótidos. Es un método para detectar la presencia así como para manipular óptimamente secuencias específicas de DNA, las cuales fueron separadas previamente por medio de la electroforesis con gel.

CONCLUSION.

Las infecciones causadas por micoplasmas son un problema constante en las explotaciones avícolas en todo el mundo, aunque los micoplasmas patógenos han sido erradicados de los principales pies de cría comerciales, éstos siguen siendo un problema importante en el pollo de engorda, productoras de huevo comercial y aún en productoras y progenitoras en países como el nuestro.

La micoplasmosis en México generalmente se diagnóstica en base a la historia clínica y las lesiones encontradas en la necropsia; así mismo se realiza una prueba serológica que es la aglutinación en placa la cual no es una prueba muy confiable debido a la gran cantidad de factores que pueden alterarla y por lo tanto hacen poco confiables los resultados, dificultando así el diagnóstico de la enfermedad.

La prueba de inhibición de la hemoaglutinación y ELISA se han utilizado como pruebas de confirmación, pero debido a las reacciones cruzadas, así como cepas atípicas que presentan diferentes propiedades biológicas en cuanto a infectividad, virulencia e inmunogenicidad; dificultan su detección y por lo tanto se requiere del aislamiento.

Ya que en México no se realiza el aislamiento de los micoplasmas en forma rutinaria y aún en los laboratorios donde se tienen los medios y la experiencia, existen problemas como sobrecrecimiento de micoplasmas no patógenos, o contaminación con otras bacterias, además del tiempo que normalmente se requiere de un mínimo de 2 y hasta 4 semanas para lograr el aislamiento, no se puede contar con otras pruebas diagnósticas más específicas como la prueba de inhibición de crecimiento, inhibición metabólica, e inmunofluorescencia.

En los últimos años se han producido avances importantes en las técnicas moleculares de ampliación de ácidos nucleicos (DNA y RNA). La técnica de mayor repercusión y excelentes ventajas para su aplicación como herramienta de diagnóstico en el laboratorio, es la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La PCR tiene el potencial de reemplazar al cultivo de micoplasma, siendo un método rápido, sensible y específico para confirmar las reacciones serológicas. De esta forma, se pueden examinar más muestras en menor tiempo. Además, la detección de los micoplasmas a nivel de especie evita el empleo de pruebas bioquímicas las cuales son laboriosas, consumen demasiado tiempo y normalmente presentan resultados erráticos.

Se busca en las pruebas sensibilidad, especificidad, exactitud, bajo costo y facilidad para realizarse, ninguna de ellas reúne todas estas bondades, por lo que la selección se efectúa considerando cuál prueba reúne las características más adecuadas para nuestros fines y de acuerdo a nuestros recursos.

En muchos casos en que se selecciona una prueba descrita en la literatura, para efectuar el diagnóstico es recomendable establecer los parámetros propios del laboratorio para el criterio de interpretación.

APENDICE.

Adyuvante. Ingrediente adicionado a las vacunas para intensificar la respuesta inmune.

Anticuerpo. Estructura protéica formada por el aparato inmunocompetente para atacar a los agentes extraños (bacterias, virus, parásitos, etc); principalmente IgA, IgG, IgE e IgM.

Antígeno. Materia extraña que activa el aparato inmunocompetente para destruirlo;(como ocurre con las vacunas) o indeseable (bacterias, virus, etc).

Especificidad. Es la habilidad de una prueba para detectar las respuestas inmunes provocadas por una sola clase de agente invasor y no aquellas producidas por otros invasores

Inmunidad humoral. Es la inmunidad creada por los anticuerpos presentes en el torrente sanguíneo.

Inmunidad mediada por células. Es la inmunidad creada por la interacción de los glóbulos blancos.

Solución molar (M): Es la que contiene 1 mol de soluto en un litro de solución. Un mol se define como el peso molecular de la sustancia expresada en gramos.

Porcentaje (%): El porcentaje de una solución indica el peso o volumen de soluto disuelto en 100 unidades de solución.

Solución amortiguadora o buffer: Es una solución capaz de resistir los cambios de pH . Generalmente esta formada por un ácido débil y su sal, o una base débil y su sal. La capacidad buffer de una solución depende principalmente de dos factores: la concentración del amortiguador y la relación entre las concentraciones del ácido y la sal. Esta relación está expresada en la ecuación de Henderson - Hasselbach, la cual puede ser usada para calcular el pH de un amortiguador o para determinar las concentraciones de sal y ácido requeridas para preparar un amortiguador de determinado pH.

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{(\text{sal})}{(\text{ácido})}$$

donde pKa= Logaritmo negativo de la constante de ionización del ácido.

(sal)= Concentración de la sal

(ácido)= Concentración del ácido

La mayor capacidad del amortiguador se tiene cuando la concentración de sal es igual a la concentración del ácido, es decir, cuando el amortiguador $\text{pH} = \text{pKa}$. Esto se debe tener en cuenta cuando se selecciona un amortiguador en el

laboratorio, tratando de escoger el sistema amortiguador cuyo pKa esté más cercano al pH en el que se quiere trabajar.

FOSFATOS, $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 0.06 7M, Ph 5.0 - 8.2

Solución A: KH_2PO_4 M/15 (9.078 g/lit)

Solución B: Na_2HPO_4 M/15 (9.47 g/lit de Na_2HPO_4 anhidro o 17.87 g/lit de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

pH	Solución A (ml/lit)	Solución B (ml/lit)	pH	Solución A (ml/lit)	Solución B (ml/lit)
5.0	988	12	6.6	627	373
5.2	980	20	6.8	508	492
5.4	967	33	7.0	392	608
5.6	948	52	7.2	285	715
5.8	919	81	7.4	196	804
6.0	877	123	7.6	132	868
6.2	815	185	7.8	86	914
6.4	732	268	8.0	55	945
			8.2	33	967

Sensibilidad. Es la habilidad de una prueba para detectar respuestas inmunológicas mínimas (por ejemplo, cantidades pequeñas de anticuerpos)

Título. Medida numérica de la fuerza de la inmunidad.

Vacuna. Microorganismos inactivados o alterados (virus, bacterias, etc), dados a los animales para prevenir o tratar alguna enfermedad infecciosa.

GLOSARIO

AF	Inmunofluorescencia
ATP	Adenocin trifosfato.
°C	Grados centígrados.
CCU	Unidades de cambio de color.
Cm	Centímetro.
CO ₂	Bióxido de carbono
DNA	Acido desoxiribonucleico.
D.O.	Densidad óptica
ERC	Enfermedad crónica respiratoria.
ERCC	Enfermedad crónica respiratoria complicada.
ELISA	Análisis de la enzima ligada a un inmunoabsorbente inerte.
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
g	Gramos.
HA	Hemoaglutinación.
ICF	Isocianato de fluoresceína.
IH	Inhibición de la hemoaglutinación.
lb	Libra
lt	Litro
M	Molar.
MG	<i>Mycoplasma gallisepticum</i> .
mg	Miligramos
ml	Mililitro
mm	Milímetro
Mm	Micromolar.
µm	Micra.
µl	Microlitro.
MS	<i>Mycoplasma synoviae</i>
NAD	Dinucleótido de nicotinamida adenina.
nm	Nanómetro.
PBS	Solución buffer fosfato.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PPLO	Pleuropneumonia.
ppm	Partes por millón
rpm	Revoluciones por minuto.
RNA _m	Acido ribonucleico mensajero
RNA _t	Acido ribonucleico transferencia.
SNC	Sistema nervioso central.
UFC	Unidades formadoras de colonias.
V/v	volumen a volumen.

BIBLIOGRAFIA

1. Baez A. J.: Patología de las aves. Editorial Trillas, México, 1994
2. Balconi, I. R.: EL Dr. Green J., Comenta sobre las Enfermedades de Aves y Cerdos más Importantes en México. Tecnología Avípecuaria. Año 7, No.76. 1994.
3. Balows A., Trüper H. G., Dworkin M., Hander W., Schleifer K. H.: The prokaryotes. Volumen II, Springer Verlag, New York Inc. 1992
4. Banda C. A.: Los antisueros en el diagnóstico avícola. III Jornada Médico Avícola. FMVZ UNAM. 1992
5. Banda C. A.: Diagnóstico avícola. Manual de Producción Avícola. UNAM. 1995
6. Calnek B. W., Barnes H. J.: Enfermedades de las aves. Primera edición. Editorial Manual Moderno. México, D.F. 1995
7. Calles Q. M.: Manual de inmunología aviar. UNAM FES-C. Tesis. 1990.
8. Carter G. R., Cole R. J.: Diagnostic procedures in Veterinary Bacteriology and Micology. Fifth edition. Copyright by Academic Press. USA. 1990
9. Carter G. R.: Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology. Edition Fourth, London, 1991.
10. Chin, R. P., Daft, B. M., Meteyer C.U. and Yamamoto, R.: Meningoencephalitis in Commercial Meat Turkeys Associated with *Mycoplasma gallisepticum*. Avian Diseases. Vol. 35, No 4,1991.
11. Chin R. P., Meteyer C. U., Yamamoto R., ShivaprasadH. Y., and Klein P, N.: isolation or *Mycoplasma synoviae* from the brain of commercial meat turkeys with meningeat vasculitis. Avian diseases. Vol. 35. No. 3.1991.
12. Coltral G. E.: Manual de métodos estandarizados en Microbiología Veterinaria. Ediciones científicas, La Prensa Mexicana S. A. México, D. F. 1986.
13. Cruz S. T. A.: Identificación de *Mycoplasma hyopneumoniae* a partir de pulmones neumónicos de cerdo en México. Tesis Licenciatura. FES-C UNAM. 1983
14. Droual R., Shivaprasad H. I, Meteyer C. U., Shapiro D. P., and Walter R. L.: Severy mortality in broiler chickens associated with *Mycoplasma synoviae* and *Pasteurella gallinarum*. Avian diseases. Vol. 36. No.3. 1992
15. Etcharren M. L. A., Rodríguez L. L. M. y Ceniceros R. M. A.: Aislamiento de *Mycoplasma sinoviae* y *Mycoplasma gallisepticum* de aves comerciales en México, identificados mediante inmunofluorescencia directa. XVII Convención Nacional ANECA. Departamento de producción animal: aves. FMVZ UNAM.1992

16. Ewing M.L., Lauerman L.H., Kleven S. H., and Brown M. B.: Evaluation of diagnostic procedures to detect *Mycoplasma synoviae* in commercial hatcheries in Florida. Avian diseases. Vol. 40. No. 4. 1996
17. Fort Dodge Animal Health.: *Mycoplasma gallisepticum* en Ponedoras y Reproductoras. Tecnologia Avipecuaria. Año 10, No. 115, 1997.
18. Glisson J. R.: Micoplasmosis aviar. Avicultura Profesional. Volumen II Número 1, 1993
19. González P. C., Lázaro T. M. I., Ortega L. L. M., Garúlo F. A., Ochoa U. G., Cruz S. T.A., Ortiz M. A.: Desarrollo de la prueba de inhibición de crecimiento para la identificación de *Mycoplasma gallisepticum*. FES.C. 1998
20. Halliwell W. R. E., Gorman T. N.: Inmunología clínica veterinaria. Editorial Acriba. Zaragoza España. 1989.
21. Howard, W; Cole. : Mycoplasmosis in animals. Laboratory diagnosis. First edition. Committee of the American Asociation of Veterinary Laboratory diagnosis. Iowa State University Press. Iowa. USA 1994
22. Jawetz, Melnick y Adelberg. : Microbiología Médica. 15ª. Edición. Editorial Manual Moderno. México D.F., 1996
23. Kleven S. H. : Avances en el control de la micoplasmosis aviar. Avicultura Profesional. Volumen II Número 2, 1990.
24. Kleven S. H., Ortiz M. A., Tolba Y. S. : Desarrollos recientes en la micoplasmosis aviar. Cuarto curso de actualización Avi-mex. Complejos respiratorios de las aves Avi-mex. México D.F. 1992
25. Kleven S. H., Hietala S. K. : Immunology techniques for avian Micoplasmas. Métodos y técnicas utilizadas en los laboratorios de la división de diagnóstico avícola en la Universidad of Georgia en Athens Georgia USA. 1996
26. Kreager K. : Pruebas serológicas en pollas y ponedoras. Unión Nacional de Avicultores. XIV PANVET, México, D.F. 1994
27. Lázaro T. M. I., González P. C., Ortega L. L. M., Garulo F. A., Ochoa U. G., Cruz S. T. A., Ortiz M. A. : Aislamiento e identificación de *Mycoplasma synoviae* mediante la prueba de inhibición de crecimiento. FES-C UNAM. 1998
28. León E. M. : Desarrollo y descripción de la técnica de ELISA en el diagnóstico avícola. III Jornada Médico Avícola. UNAM .1992
29. Leon, T. H. : Enfermedades respiratorias. Patología e inmunidad. Laboratorio de diagnóstico de las enfermedades animales. Avirama. Año 2. Volumen 2. No 15-108, 1992.

30. Maniloff J., McEhanev N. R., Fich R. L., Baseman B. J. : *Mycoplasmas Molecular biology and pathogenesis*. American Society for Microbiology, Washington, B C. 1992
31. Marquez R. M. A. : Control y erradicación del *Mycoplasma synoviae* en dos integraciones avícolas de progenitoras y reproductoras pesadas. V Jomada Médico Avícola. Departamento de producción animal: aves. FMVZ UNAM.1995
32. Mc Pherson M. J., Quirk P. Taylor G. R. : *PCR a Practical Approach*. Orford University Press, England. 1992.
33. Meolemans G. Lancaster J. L. : *Recopilativo de las enfermedades aviares*. Office Internation Epizoties. Serie Técnica No 8, 1988
34. Migaki, T. T., Avakian, A. P., Baenes, D. H., Magonigle, R. A. : Efficacy of Danofloxacin and Tylosin in the control of Mycoplasmosis in Chicks Infected with Tylosin-Susceptible or Tylosin-Resistant Field Isolates of *Mycoplasma gallisepticum*. Avian Diseases. Vol. 37. No. 2, 1992.
35. Muhammed Y., Eloyes H. : *Microbiology for veterinary technicians*. American Veterinary Publications California. 1991.
36. Morilla G. A., Bautista G. C. R. : *Manual de inmunología*. Editorial Diana. México D. F. 1986.
37. Ortiz M. A. and Kleven S. H. : Serological detection of *Mycoplasma synoviae* infección in turkeys. Avian diseases. Vol. 36. No. 3. 1991.
38. Ortiz M. A.: Control de la micoplasmosis aviar. Avirama. Año 2. Volumen 2. No 12-105. 1992
39. Ortiz M. A., Kleven S. H. : Efectos de los antibióticos y vacunación en la colonización de la tráquea aviar por *Mycoplasma gallisepticum*. Avirama. Año 3, Volumen 3, No 23-126, 1993
40. Ortiz, A. M. and Kleven S. W. : Evaluación of Baytril against Egg Transmission of *Mycoplasma gallisepticum*. Enviado para representación Xth Congress of the World Veterinary Poultry Association, Sydney Australia, 1993.
41. Ortiz, M. A. : Erradique la micoplasmosis. Síntesis Avícola. Año 12, No. 1. 1994
42. Ortiz, M. A., Kleven S. H. : Comparación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el aislamiento para el diagnóstico de *Mycoplasma gallisepticum*. Memorias XXII Convención anual ANECA. Ixtapa Zihuatanejo. 7 al 11 mayo 1997
43. Ortiz, M. A., Ochoa U. G. : Vacunación o terapéutica para el control de micoplasmosis aviar. VI Jomada Médico Avícola. FES-C, UNAM. 1997
44. Osorio, M. A. : *Mycoplasma synoviae*: Revisión. Avirama. Año 3, Volumen 3, No 27-120, 1993.

45. Oyarzabai A. O. : Técnicas moleculares para el diagnóstico de patógenos aviares. *Avicultura Profesional*. Vol. 14. N. 6 1996
46. Pérez M. V. : Serología de Ponedoras con Baja Postura, Estudios de Campo en México. *Tecnología Avipecuaria*. Año 2, No 15, 1989.
47. Quiroz M., Salado R., Morales R. : Control de *M. gallisepticum* con una vacuna viva liofilizada capa 6/85. AVECAO A. C. Memorias Simposium sobre enfermedades infecciosas. 1998.
48. Randall, C. J. : Enfermedades de las aves domésticas y de corral. Editorial Interamericana Mc. Graw Hill. España. 1989
49. Shane M. S. : El diagnóstico de algunas enfermedades aviares emergentes y significativas. *Tecnología avipecuaria*. Año 8 No. 86. 1995.
50. Soto, P.E. : Panorama actual de las enfermedades respiratorias de las aves de México. Cuarto curso de actualización Avi-mex. Complejo respiratorio de las aves.. Avi-mex, Méx. DF. 1992
51. Soto. P. E. : El uso de una vacuna viva en la prevención, control y erradicación de el *M. synoviae*. AVECAO A. C. Memorias Simposium sobre enfermedades infecciosas. 1998
52. Stanier R. Y., Adelberg E. A., Ingraham J. L. : Microbiología. Cuarta edición. Editorial Reverté, Barcelona España. 1986.
53. Yamamoto R., Khan M.I., Zhao S., Nasamento E.R., Charlton B. : Molecular Methods used for detecting and fingerprinting pathogenic avian Mycoplasmas. Métodos y técnicas utilizados en los laboratorios de la división de diagnóstico avícola en la Universidad de California USA. 1996.