



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTILÁN**

**“AISLAMIENTO DE *Mycoplasma spp* A  
DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACIÓN DE  
CULTIVO PRIMARIO DE GALLINAS COMERCIALES”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA  
P R E S E N T A:  
EDGAR ENRIQUE TAPIA LÓPEZ

ASESOR: MVZ. MPVM PHD. ARIEL ORTIZ MUÑÍZ  
COASESOR: MVZ. MSC. ERNESTO SOTO PRIANTE



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

---

---

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Cuatitlan por todas sus enseñanzas.

A mis padres por que han sido el mejor ejemplo a seguir, gracias por su amor, apoyo y confianza en todos los momentos de mi vida. Los quiero muchísimo.

A mis hermanos por ser los mejores amigos que he tenido, gracias por todos los momentos que hemos pasado juntos.

A Jessica por ser parte de mi vida, por todo su amor, comprensión y apoyo.

Gracias por todo este tiempo.

Al Dr Ernesto Soto Priante por todos sus conocimientos, gracias por su confianza y por guiarme para completar un paso más en mi carrera. Al Dr Ariel Ortiz por todo su tiempo y conocimientos para la realización de este trabajo.

A la Dra Refugio Cortés y la Dra Rosalía Viguera por su amistad y su inmensa ayuda.

Al Dr Bernardo Lozano por ser una increíble persona. A Diagnósticos Clínicos Veterinarios y Laboratorios Avimex por su amistad y confianza.

---

---

---

# CONTENIDO

	Página
Índice de Cuadros.....	iii
Índice de Gráficas.....	iii
Índice de Imágenes.....	iii
Resumen.....	iv
I Introducción.....	1
II Revisión de la Literatura.....	4
2.1. Descripción General de los Micoplasmas.....	4
2.1.1. Definición de <i>Mycoplasma spp.</i> .....	4
2.1.2. Clase Mollicutes.....	5
2.1.3. Género <i>Mycoplasma spp.</i> .....	7
2.1.4. Biología de los Micoplasmas.....	7
2.2. Micoplasmosis Aviar.....	9
2.2.1. Definición y Sinonimia.....	9
2.2.2. Historia.....	10
2.2.3. Importancia Económica y Salud Pública.....	11
2.2.4. Incidencia y Distribución.....	12
2.2.5. Epidemiología.....	12
2.2.6. Transmisión y Periodo de Incubación.....	14
2.2.7. Signos Clínicos y Lesiones.....	15
2.2.8. Diagnóstico.....	16
2.2.9. Prevención y Control.....	17
2.3. Aislamiento de <i>Mycoplasma spp.</i> .....	18
2.3.1. Requerimientos Nutricionales.....	18
2.3.2. Aislamiento a partir de Muestras Clínicas.....	20
III Justificación del Estudio.....	25
IV Hipótesis y Objetivos .....	27
4.1. Hipótesis.....	27
4.2. Objetivos.....	27
V Materiales y Métodos.....	29
VI Resultados.....	33
VII Discusión.....	40
VIII Conclusiones y Recomendaciones.....	44
Literatura Citada.....	47
Anexos.....	50
Anexo I: Metodología para la elaboración de medio de cultivo líquido de Frey 2X.....	50

---

Anexo II. Metodología para la elaboración de medio de cultivo sólido de Frey.....	51
Anexo III. Tabla de resultados de aislamientos de <i>Mycoplasma spp</i> obtenidos de acuerdo al tiempo de incubación de cultivos primarios.....	52
Anexo IV. Fotografías.....	53

---

---

---

## Índice de Cuadros

	Página
Cuadro 1. Clasificación de micoplasmas aviaries.....	5
Cuadro 2. Características de la clase Mollicutes.....	6
Cuadro 3. Características bioquímicas de los micoplasmas aviaries.....	24
Cuadro 4. Total de aislamientos de micoplasma obtenidos.....	33
Cuadro 5. Aislamientos de <i>Mycoplasma spp</i> obtenidos en los cuatro tiempos de incubación de cultivo primario.....	34
Cuadro 6. Días de incubación requeridos para presentar crecimiento de colonias de <i>Mycoplasma spp</i> en placa.....	36
Cuadro 7. Muestras con cambio de pH en medio líquido.....	37
Cuadro 8. Valores descriptivos.....	39
Cuadro 9. Prueba "t" de estudiante ( <i>Student "t"</i> ) para conocer el comportamiento entre tiempos de incubación.....	39

## Índice de Gráficas

	Página
Gráfica 1. Porcentaje de aislamientos de <i>Mycoplasma spp</i> .....	33
Gráfica 2. Número de aislamientos de <i>Mycoplasma spp</i> con relación al tiempo de incubación.....	34
Gráfica 3. Promedio en días de incubación en placa para crecimiento de <i>Mycoplasma spp</i> .....	36
Gráfica 4. Número de cultivos primarios con modificación del pH.....	37

## Índice de Imágenes

	Página
Imagen 1. Procedimiento de aislamiento a cuatro tiempos.....	32

---

---

---

## Resumen

La micoplasmosis aviar es una de las enfermedades de mayor incidencia en la avicultura mexicana con un efecto económico muy importante. El aislamiento es considerado la prueba estándar para el diagnóstico de la micoplasmosis aviar, sin embargo este procedimiento presenta varias dificultades debido a las características de crecimiento de los micoplasmas en medios de cultivo. El objetivo fue evaluar el efecto de la incubación en 4 tiempos (días) para la obtención de aislamientos de *Mycoplasma spp* realizados a partir de cultivo primario en medio líquido de hisopos traqueales de gallinas comerciales. Para esto, fue necesario introducir un hisopo de madera en la tráquea de las aves vivas y mediante un movimiento giratorio tomar la muestra, la cual es introducida en medio líquido de Frey en el que es agitado vigorosamente y posteriormente desechado obteniendo el cultivo primario. El intervalo entre cada tiempo fue de 5 días de incubación partiendo del tiempo 1 como el día 0 de incubación (sin incubación) hasta el tiempo 4 con 15 días de incubación. Los resultados obtenidos muestran que al aplicar una incubación en los cultivos primarios se obtienen tasas del 17% (tiempo 2), 12% (tiempo 3) y 3% (tiempo 4), comparado con un 2% de aislamientos obtenidos en el tiempo 1. Además, se observó que no existe diferencia significativa en el tiempo de incubación de placas ya que se requirieron de 2 a 4 días para obtener colonias de *Mycoplasma spp*.

---

---

## I. Introducción

La avicultura es uno de los sistemas de producción más importantes a nivel mundial. Dentro del sector pecuario de México, la avicultura es el subsector más dinámico con un crecimiento promedio en los últimos ocho años del 6.8% anual y es uno de los más importantes a nivel mundial (UNA, 2004).

La micoplasmosis es uno de los grandes problemas que afectan la salud de las aves en producción, afectando directamente los parámetros productivos de las parvadas (Kleven, 1994; Kleven, 2000; Chin, 2003; Ley, 2003; Kleven, 2003a).

Existen varias especies de micoplasmas que afectan a las aves. Se reconocen tres especies patógenas *M. gallisepticum*, *M. synoviae* y *M. meleagridis* que producen problemas generalizados a nivel respiratorio y decremento en la producción de huevo en gallinas, pavos y otras especies aviares. Principalmente se observa una severa aerosaculitis, tos y disminución en la ganancia de peso. Las tres especies patógenas son transmitidas verticalmente y son diseminadas lateralmente por contacto directo e indirecto (Rosenbusch, 1994; Kleven, 2004).

El control de la micoplasmosis aviar debe llevarse a cabo preferentemente con medidas de bioseguridad que incluyen la selección de pies de cría libres de esta infección bacteriana que se caracteriza por ser altamente contagiosa, mientras que en países que no cuentan con una rigurosa legislación sanitaria de la carne el control se realiza con programas profilácticos mediante la administración de productos antimicoplásmicos, sin previo conocimiento de la especie presente ni

---



la verdadera efectividad del producto elegido sobre la cepa presente (Soto, 2002).

Los micoplasmas son bacterias procariotas protegidas únicamente por una membrana plasmática y carecen de una pared celular. Dentro del ámbito de la microbiología son conocidos como organismos “fastidiosos” debido a sus características de cultivo y lo difícil de su crecimiento en subcultivos, ocasionando problemas para su aislamiento y multiplicación *in vitro* (Kleven, 1994; Rosenbusch, 1994; Kleven, 2003a).

Hasta la fecha, se han publicado estudios sobre la presencia de los micoplasmas aviáres en México que hacen referencia básicamente a las pruebas serológicas con suero o sangre completa y muy pocos estudios que implican el aislamiento e identificación de las especies patógenas para las gallinas como son *M. gallisepticum* y *M. synoviae* (Etcharren, 1992; Pérez, 1993; Soto, 2001; Valladares, 2002).

Debido a que los micoplasmas carecen de pared celular, los medios usados para el aislamiento deben contener proteína y ser complementados con una fuente de esteroides (suero porcino o equino en un 10 a 20%) y ácidos grasos. Estos factores son determinantes para el aislamiento (Rosenbusch, 1994).

Para el aislamiento de micoplasmas aviáres se recomienda tomar muestras de tejidos visiblemente afectados de animales enfermos con hisopos traqueales y de la fisura palatina en medio líquido de “Frey”. Debido a sus características de crecimiento, las muestras deben ser tomadas procurando evitar la contaminación, ya que el medio en el que son sembradas es muy rico. Una vez recibidos en el laboratorio, son sembrados en placa de manera rutinaria; sin embargo, para incrementar la probabilidad de crecimiento se recomienda incubar en medio líquido durante 2 a 3 días para posteriormente ser sembrada en placa. Las placas deben ser incubadas a 37 °C durante 20 días antes de

descartar la presencia de micoplasmas (Kleven, 1994, Kleven, 2003a; Kleven, 2004).

La aplicación práctica de este trabajo, es evaluar la incubación de cultivos primarios en diferentes tiempos a partir de muestras de campo que permitan obtener una mayor probabilidad de aislamientos de micoplasmas en agar. Generalmente el aislamiento implica un periodo de incubación de 20 días, el aplicar una incubación inicial del cultivo primario (muestras en medio líquido de Frey) podría reducir el tiempo y aumentar la probabilidad de aislamiento para ser utilizadas por los laboratorios de diagnóstico que realicen el aislamiento de micoplasmas.

## II. Revisión de la Literatura

### 2.1. Descripción General de los Micoplasmas

#### 2.1.1. Definición de *Mycoplasma spp*

Los micoplasmas son las bacterias más pequeñas de vida libre que se conocen. Son procariotas y poseen un genoma pequeño. Se desarrollan en medios artificiales complejos y poseen un metabolismo principalmente fermentativo y la mayoría son anaerobios facultativos. Existen especies saprofitas y parásitos de vegetales y animales (Holt, 1994).

Pertenecen a la clase Mollicutes (*mollis* - suave, *cutis* - piel), orden Mycoplasmatales, familia Mycoplasmataceae, género *Mycoplasma* y con numerosas especies integrantes (Cuadro 1). Debido a sus características biológicas generan dificultades para su diagnóstico. No poseen pared celular, lo cual determina su pleomorfismo, su elevada sensibilidad al pH, a los gradientes osmóticos y su resistencia natural a antibióticos que actúan sobre la pared celular bacteriana. Poseen una membrana citoplasmática trilaminar, rica en esteroides como el colesterol. La multiplicación es por fisión binaria y dada su capacidad biosintética limitada, son muy exigentes nutricionalmente, requiriendo esteroides, ácidos grasos, purinas y pirimidinas (Yoder, 1990; Holt, 1994; Rosenbusch, 1994).

En las aves, los micoplasmas producen infecciones graves en el aparato respiratorio y en las articulaciones (Yoder, 1990; Kleven, 2003a; Kleven, 2004).

Existen varias especies que afectan a las aves y solamente unas cuantas son patógenas, como *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* y *Mycoplasma meleagridis*. La enfermedad se caracteriza por estertores respiratorios, tos, descarga nasal, conjuntivitis; y en el caso de *M. synoviae* de sinovitis. En pavos se caracteriza principalmente por sinusitis infraorbital. Las manifestaciones clínicas son observadas por una lenta disminución en el desarrollo y se caracteriza por un curso largo (Kleven, 2003a; Kleven, 2004).

Cuadro 1. Clasificación de micoplasmas aviares

<b>Imperio:</b>	Eubacteria
<b>Reino:</b>	Procaryotae
<b>División:</b>	Eubacterias desprovistas de pared celular
<b>Clase:</b>	Mollicutes
<b>Orden I:</b>	Mycoplasmatales
<b>Familia:</b>	Mycoplasmataceae
<b>Género I:</b>	<i>Mycoplasma</i>
<b>Especie:</b>	<i>M. synoviae</i> ; <i>M. gallisepticum</i> ; <i>M. meleagridis</i> ; <i>M. iowae</i> ; <i>M. gallinarum</i> ; <i>M. imitans</i> , <i>M. laidlawii</i> , <i>M. anatis</i> , <i>M. anseris</i> , <i>M. cloacale</i> , <i>M. columbinasale</i> , <i>M. columbinum</i> , <i>M. columborale</i> , <i>M. gallinaceum</i> , <i>M. gallopavonis</i> , <i>M. glycyphilum</i> , <i>M. iners</i> , <i>M. lipofaciens</i> , <i>M. pullorum</i> ,

Holt, 1994; Rosenbusch, 1994.

### 2.1.2. Clase Mollicutes

Consiste de células procariotas Gram negativas muy pequeñas, totalmente desprovistas de pared celular, limitada solamente por una membrana

plasmática, incapaz de sintetizar peptidoglican y sus precursores. Consecuentemente, son resistentes a la penicilina y sus análogos, además de ser sensibles a la lisis por shock osmótico, detergentes y alcoholes. Presentan un amplio pleomorfismo. La replicación del genoma precede, pero no necesariamente, sincronizada con una división celular. Usualmente son no motiles (Holt, 1994).

Las especies reconocidas hasta ahora pueden crecer en medios de cultivo artificiales. La mayoría requiere de esteroides y ácidos grasos para su crecimiento, sin embargo, ciertas cepas pueden crecer pobremente en medios artificiales y pueden ser más fácilmente aisladas por procedimientos de cultivo celular. La mayoría de las especies son anaerobias facultativas, pero algunas son anaerobias estrictas e incluso pueden morir a la exposición de cantidades mínimas de oxígeno (Cuadro 2) (Holt, 1994).

Cuadro 2. Características de la clase Mollicutes

<b>I. Anaerobio facultativo o microaerofílico</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Requerimientos de esteroles             <ul style="list-style-type: none"> <li>i. Células helicoidales durante el crecimiento logarítmico                 <ul style="list-style-type: none"> <li>a. <i>Spiroplasma</i></li> </ul> </li> <li>ii. Células no helicoidales                 <ul style="list-style-type: none"> <li>1. Ureasa positivo                     <ul style="list-style-type: none"> <li>a. <i>Ureaplasma</i></li> </ul> </li> <li>2. Ureasa negativo                     <ul style="list-style-type: none"> <li>a. <b><i>Mycoplasma</i></b></li> </ul> </li> </ul> </li> </ul> </li> <li>• Sin requerimientos de esteroles             <ul style="list-style-type: none"> <li>a. <i>Acholeplasma</i></li> </ul> </li> </ul>
<b>II. Anaerobio obligado</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Requerimientos de esteroles             <ul style="list-style-type: none"> <li>a. <i>Anaeroplasma</i></li> </ul> </li> <li>• Sin requerimientos de esteroles             <ul style="list-style-type: none"> <li>a. <i>Asteroplasma</i></li> </ul> </li> </ul>

Rosenbusch, 1994.

Las colonias en medios sólidos usualmente son más pequeñas de 1 mm de diámetro. Se ha observado que existe una tendencia de los organismos a penetrar y crecer dentro del medio (Holt, 1994).

Todos los organismos del grupo Mollicutes son parásitos, comensales o saprofitos y varios de ellos son patógenos de los humanos, animales, plantas e insectos. El tamaño del genoma varía de  $5 \times 10^8$  a  $1 \times 10^9$  Daltons; siendo uno de los organismos más pequeños registrados dentro del grupo de los procariotas (Holt, 1994).

### 2.1.3. Género *Mycoplasma spp*

Presentan pleomorfismo variando en formas que van de esféricas, ligeramente ovoides o piriformes de 0.3 – 0.8  $\mu\text{m}$  en diámetro; a delgados filamentos de diámetro uniforme, con un rango en longitud de 15  $\mu\text{m}$ . Usualmente son no móviles, pero algunas especies pueden presentar deslizamiento. Las colonias son muy pequeñas (menores a 1 mm en diámetro). La forma típica de la colonia, bajo condiciones apropiadas, tiene la apariencia de “huevo estrellado” (Holt, 1994).

Dentro de sus características bioquímicas se reconoce que son catalasa negativo y quimiorganotróficas, utilizando algunos azúcares o arginina como su mayor fuente de energía. Para su crecimiento requieren de colesterol o esteroides. Son parásitos y patógenos de un amplio rango de hospedadores mamíferos y aves. Algunas especies se encuentran en la superficie de plantas e insectos (Holt, 1994; Rosenbusch, 1994).

### 2.1.4. Biología de los Micoplasmas

Son procariotas que carecen de varias de las capacidades normalmente expresadas por la mayoría de las demás bacterias. Entre las diferencias más

notables, se encuentra la inhabilidad de sintetizar una pared celular. La ausencia de ésta ha sido usada como una de las bases primarias para la inclusión de un organismo en la clase *Mollicutes* y este rasgo puede ser documentado por la demostración de una sola membrana trilaminar delimitando al organismo. En adición, la ausencia de material y proteínas asociadas a la pared celular permite a los micoplasmas resistir a la acción de antibióticos que interactúan con estas proteínas, como la penicilina. Los micoplasmas tienen un genoma pequeño y su porcentaje de guanina + citosina (G + C) es muy bajo (23 - 40 %), por lo que una sola parte del total del genoma es utilizado para la expresión de información genética. Como consecuencia de su limitado potencial genético, los micoplasmas usualmente requieren una íntima asociación con la superficie de células y manifiestan un requerimiento complejo nutricional para su crecimiento *in vitro*. Algunas características como son el tamaño pequeño, la cercana asociación con células y la resistencia a la penicilina, son usados para diseñar estrategias para su aislamiento a partir de muestras clínicas (Yoder, 1990; Holt, 1994; Rosenbusch, 1994; Kleven, 2000; Kleven 2003a).

La resistencia al ambiente de los micoplasmas es de particular interés, dado que pueden ser agentes de enfermedades infecciosas. Pueden ser muy resistentes cuando son mantenidos en un medio rico en proteínas, humedad y ambientes fríos. Por ejemplo, *M. dispar* ha mostrado viabilidad infectiva en pulmones mantenidos a 4 °C por 14 días. En contraste, varias bacterias pueden ser destruidas por actividad autolítica en periodos de tiempo más cortos, bajo las mismas condiciones (Rosenbusch, 1994).

Es conocido que los micoplasmas son altamente específicos de hospedero en términos de enfermedad. Mientras la mayoría de los micoplasmas parecen tener un huésped específico, otros pueden ser patógenos en una especie y colonizar otras especies sin expresar patogenicidad, por ejemplo *M. gallisepticum* de aves en bovinos. Algunas especies parecen tener menor especificidad pero suelen ser no patógenas. Se puede observar diferentes

especies de micoplasmas en muestras de animales infectados (Rosenbusch, 1994).

Los micoplasmas patógenos tienen predilección por el aparato respiratorio, mucosa ocular y genital, estableciendo una infección persistente. La diseminación sistémica y sinovial es seguida de la colonización de mucosas, particularmente en hospedadores con defensas débiles. Algunas especies de micoplasmas tienen propiedades invasivas; éstas especies pueden diseminarse y afectar superficies serosas de las cavidades torácica, abdominal y articular de los animales, causando enfermedades clínicas severas (Rosenbusch, 1994).

## **2.2. Micoplasmosis Aviar**

### 2.2.1. Definición y Sinonimia

La micoplasmosis aviar es una infección ocasionada por micoplasmas específicos de aves y comúnmente es conocida como *Enfermedad Crónica Respiratoria* (ECR) en gallinas, y como *Sinusitis Infecciosa* en pavos. La enfermedad se caracteriza clínicamente por estertores, tos, descarga nasal y conjuntivitis, y en pavos por sinusitis infraorbital. Las manifestaciones clínicas son observadas por una lenta disminución en el desarrollo y se caracteriza por un curso largo.

Cuando la micoplasmosis es complicada con infecciones de tipo viral (Bronquitis Infecciosa, Enfermedad de Newcastle, etc) o de tipo bacteriana (*Escherichia coli*) se le conoce como *Enfermedad de los Sacos Aéreos* o *Enfermedad Crónica Respiratoria Complicada* (Yoder, 1990; Ley, 2003; Kleven, 2004).



### 2.2.2. Historia

La primera descripción de la enfermedad por micoplasmas en aves fue hecha en 1905 por Dodd en Inglaterra, el cual le asignó el nombre de *Pneumoenteritis Epizoótica* del pavo. Posteriormente, en 1938, Dickinson y Hinshaw nombraron a la enfermedad como *Sinusitis Infeciosa*. En la década de los 30's, Nelson realizó los primeros aislamientos de micoplasmas aviares. El primer aislamiento de *M. gallisepticum* fue realizado por Delaplane y Stuart en 1943 a partir de gallinas y más tarde en pavos con problemas de sinusitis; este aislamiento fue realizado en embrión de pollo como medio de cultivo (Kleven, 1994; Ley, 2003; Kleven, 2003b).

En la década de los 50's se realizaron los primeros aislamientos de micoplasmas usando medios artificiales, y fueron denominados como microorganismo del grupo *Pleuropneumoniae like organism's* (PPLO), estos trabajos fueron realizados por Markham y Wong, así como los de Van Roekel y Olesiuk (Ley, 2003).

Fue hasta 1957 cuando se detectaron diferencias importantes entre micoplasmas, que permitieron la diferenciación entre géneros y posteriormente de especies (Kleven, 1994; Kleven, 2003c).

El primer aislamiento de *M. meleagridis* fue realizado por Adler y Col. en 1958, a partir de pavitos con problemas de aerosaculitis (Chin, 2003).

En 1960, Chalquest y Fabricant detectaron la presencia de colonias con crecimiento satelital a colonias de *Micrococcus spp*, identificando un micoplasma con necesidades de nicotinamida-adenín-dinucleótido (NAD). En 1964, Olson y Col. realizaron estudios de diferentes aislamientos de micoplasmas dependientes de NAD, los cual los agruparon como *Mycoplasma synoviae*, y en 1982 este nombre fue elevado al rango de especie (Kleven, 2003b).

En 1962 Yoder y Hofstad, realizaron el aislamiento de un micoplasma con características diferentes a *M. gallisepticum*, *M. meleagridis* y *M. synoviae*. Este aislamiento fue clasificado por Jordan y Col. en 1982, siendo designado como *Mycoplasma iowae* (Bradbury, 2003).

En 1967, Dierks y Col., aislaron una cepa de micoplasma considerado como un organismo no patógeno, denominado *Mycoplasma gallinarum*. Aislamientos posteriores realizados por Kleven y Col., demostraron que el microorganismo puede ser patógeno cuando se combina con virus activos respiratorios (Kleven, 2003c).

A partir de 1993, se han realizado diferentes estudios de aislamientos de otras especies de micoplasmas en las aves de manera saprofita. Dentro de estos aislamientos se consideran las siguientes especies en gallinas: *M. laidlawii*, *M. gallinaceum*, *M. glycyphilum*, *M. lipofaciens* y *M. pullorum*; y en pavos: *M. gallopavonis* y *M. cloacale* (Kleven, 1994).

### 2.2.3. Importancia Económica y Salud Pública

Aunque la infección por micoplasmas aviares no es de importancia en la salud pública, es probablemente la infección bacteriana más problemática y costosa. Las pérdidas económicas por decomisos de canales, la reducción en la eficiencia alimenticia y producción de huevo y el incremento en los costos de medicación, son factores adicionales que hacen de esta enfermedad una de las más costosas en la producción avícola a nivel mundial (Kleven, 1994; Rosenbusch, 1994; Chin, 2003; Ley, 2003; Kleven, 2003a; Kleven, 2004).

Los programas de prevención y control, que incluyen monitoreos (serológicos, aislamientos e identificación), y vacunación, aumentan más los costos. La especie *M. gallisepticum* es el micoplasma más patógeno y de mayor importancia económica en la avicultura y conjuntamente con *M. synoviae* y *M.*

*meleagridis* producen grandes pérdidas económicas, debido a la elevada mortalidad entre un 5 y 30% y son causa primaria de decomisos en rastro por aerosaculitis. La transmisión vertical de los micoplasmas puede causar problemas en el nacimiento y posteriormente en la progenie. A nivel de incubadora puede producir lesiones en sacos aéreos (aerosaculitis) en los embriones, produciendo una disminución en nacimientos hasta en un 6% (Soto, 2001; Glisson, 2003; Ley, 2003; Kleven, 2003a).

En estudios realizados por Kleven, 2003 y Ley, 2003, observaron que *M. gallisepticum* y *M. synoviae* disminuyen la producción de huevo para plato en gallinas comerciales desde 15 hasta 25 huevos por ciclo respectivamente.

Particularmente, *M. synoviae* causa problemas articulares en aves reproductoras, aumentando el número de animales de desecho hasta en un 15%, con una disminución en la fertilidad hasta en 10% y un aumento de los gastos de medicación (Kleven, 2003b).

#### 2.2.4. Incidencia y Distribución

Los micoplasmas presentan una distribución mundial. En México la incidencia de *M. gallisepticum* se encuentra distribuida aproximadamente en un 20% del total de aves reproductoras, 30% del total de pollos de engorda y 75% del total de gallinas de postura. En el caso de *M. synoviae*, éste presenta una incidencia relativamente alta, infectando aproximadamente el 40% del total de reproductoras, 70% del total de pollos de engorda y 75% del total de gallinas de postura (Etcharren, 1992; Soto, 2001).

#### 2.2.5. Epidemiología

De forma natural *M. gallisepticum* puede infectar a cualquier tipo de ave siendo patógeno prácticamente en todos los casos, se considera que las aves jóvenes

son más susceptibles a la infección. El sitio de colonización de los micoplasmas es el tracto respiratorio alto, principalmente en tráquea. La infección causada por *M. gallisepticum* (ERC) en los pollos, se manifiesta como un problema respiratorio que afecta principalmente aves menores de 10 semanas de edad, causando lesiones de aerosaculitis, sinusitis, pericarditis, perihepatitis y una septicemia crónica. En aves reproductoras disminuye la producción de huevo y la fertilidad. La transmisión vertical induce problemas de aerosaculitis en los embriones y disminuye la tasa de nacimiento. (Ley, 2003).

Por su parte, *M. synoviae* infecta al pollo, pavo, gallinas de guinea, pichones, patos, gansos, codornices y perdices. En pavos, la aerosaculitis puede ser observada desde el primer día de edad. Las cepas de *M. synoviae* presentan una variación considerable en su patogenicidad que pueden ocasionar desde signos ligeros hasta una severa infección. Además, puede causar un proceso similar a la ERC en aves menores de 10 semanas de edad, aunque de menor severidad (Kleven, 2003b).

En cuanto a *M. meleagridis*, infecta únicamente a los pavos en donde produce una severa sinusitis y ERC, acompañada de alta mortalidad y disminución considerable de los parámetros productivos. La transmisión vertical causa los mismos efectos en los embriones y la progenie. *M. meleagridis* es considerado como el micoplasma más patógeno para los pavos. No se ha podido reproducir el cuadro clínico en pollos o gallinas, ni siquiera bajo condiciones experimentales. A la fecha no se han reportado variaciones antigénicas hacia *M. meleagridis*, aunque si se han encontrado variaciones en su patogenicidad (Chin, 2003).

Los problemas respiratorios clínicos de *M. gallisepticum*, *M. synoviae* y *M. meleagridis* se observan con mayor severidad cuando se asocian con virus respiratorios. Los problemas de aerosaculitis son exacerbados por efectos del medio ambiente como el frío, procesos inmunodepresores como la enfermedad

de Marek o Gumboro. Algunas cepas tienen la capacidad de infectar otros tejidos, como el cerebro y el aparato reproductor (Chin, 2003; Ley, 2003; Kleven, 2003b; Kleven, 2004).

La infección natural con *M. gallisepticum*, *M. synoviae* y *M. meleagridis* ha sido observada desde la primera semana de edad, pero generalmente la presentación clínica se observa a partir de la cuarta semana. La infección persiste de por vida en las aves afectadas, quedando así como portadoras sanas y, fuente de contaminación para aves susceptibles (Chin, 2003; Kleven, 2003 b; Ley, 2003).

#### 2.2.6. Transmisión y Periodo de Incubación

La transmisión horizontal ocurre rápidamente por contacto directo e indirecto de aves con infección clínica o subclínica a aves susceptibles, resultando en una alta prevalencia de la enfermedad en las parvadas. El tracto respiratorio superior y la conjuntiva son las principales puertas de entrada para los micoplasmas en forma de aerosoles. Por ejemplo, *M. gallisepticum* puede sobrevivir unos cuantos días fuera del hospedero, por lo que los portadores son importantes en la epidemiología. Sin embargo, una transmisión adicional y con mayor rango ocurre por fomites, mediante heces, plumas y personal. La especie *M. gallisepticum* puede permanecer viable en heces de 1 a 3 días a 20 °C, sobre la ropa por 3 días a 2 °C y en yema por 18 semanas a 37 °C o 6 semanas a 20 °C. En la cavidad nasal de los humanos puede permanecer vivo alrededor de 24 horas; sobre algodón y plástico por 2 días, sobre el cabello humano por 3 días y en plumas por 2 a 4 días (Ley, 2003).

La diseminación horizontal en las parvadas ha sido descrita en cuatro fases:

- Fase 1 (latente), antes de que los anticuerpos sean detectados.

- Fase 2, en el que la infección aparece gradualmente en un 5 a 10% de la población.
- Fase 3, en el que 90 – 95% de la población restante, desarrolla anticuerpos.
- Fase 4 (terminal), en la que el resto de la población se convierte seropositiva.

Presenta una difusión extremadamente rápida; se transmite por contacto directo o por aerosoles, con un período de incubación entre 11 y 21 días al 100% de las aves, aunque sólo unas cuantas desarrollan sinovitis y prácticamente todas pueden desarrollar problemas respiratorios entre 17 y 21 días posinfección (Ley, 2003).

La transmisión vertical (*in ovo*, transovárica) ocurre en huevo por la infección natural de gallinas. Durante la fase aguda ocurre el mayor porcentaje de transmisión. En las infecciones crónicas bajo condiciones de campo, la transmisión en huevo ocurre a un nivel más bajo. Es la transmisión más importante en todos los micoplasmas, causando infertilidad, muerte de los embriones y prole con infección traqueal al día de edad, pudiéndose detectar problemas de sinovitis y ERC al sexto día de edad (Ley, 2003).

La transmisión vertical es mayor entre 4 y 6 semanas posinfección, pero puede ocurrir en cualquier momento, sobre todo bajo periodos de estrés y bajo efectos de procesos inmunodepresores de las madres (Chin, 2003; Ley, 2003; Kleven, 2003a; Kleven, 2003b).

#### 2.2.7. Signos Clínicos y Lesiones

La presentación y severidad de los signos clínicos están determinados por la edad de las aves, factores predisponentes (principalmente ambientales y estrés) y factores complicantes (infecciones virales y bacterianas), así como la patogenicidad de la cepa (Ley, 2003).

Los signos más característicos en parvadas adultas son estertores traqueales, descarga nasal y tos. El consumo de alimento se reduce y las aves pierden peso. En gallinas comerciales, la producción de huevo declina y se mantiene en niveles bajos. Los machos frecuentemente presentan signos más pronunciados y la enfermedad es más severa durante invierno. Se puede presentar conjuntivitis con inflamación de la cara y de los párpados (Ley, 2003; Kleven, 2004).

Las lesiones más comunes son aerosaculitis, pericarditis, perihepatitis, neumonía, sinusitis, traqueitis y presencia de tapón caseoso en los bronquios. Los efectos son la desuniformidad de la parvada, mortalidad, altos costos de medicación, decomisos en el rastro y menor producción de huevo (Chin, 2003; Ley, 2003; Kleven, 2003a; Kleven, 2003b).

Las aves con sinovitis infecciosa presentan inflamación de articulaciones, claudicación y postración. Las lesiones características son sinovitis exudativa, tendovaginitis, bursitis articular y artritis (Ley, 2003; Kleven, 2003b).

Los embriones con infección vertical presentan aerosaculitis y una mayor tasa de mortalidad en etapa tardía de incubación (2 días antes del nacimiento), considerándose embriones picados (Ley, 2003; Kleven, 2003a; Kleven, 2003b).

#### 2.2.8. Diagnóstico

La prueba estándar para el diagnóstico de micoplasmas es el aislamiento del organismo. El cultivo se realiza a partir de tráquea, sacos aéreos, pulmones o fluidos de senos infraorbitarios y puede estar presente en oviducto, semen y cloaca. Para la identificación de especies se realiza la prueba de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa (Ley, 2003; Kleven, 2003b; Kleven, 2004).

Otro método es mediante la inoculación a embriones de 7 días en el saco vitelino de la suspensión de los órganos o de los exudados. El inóculo debe estar libre de contaminación bacteriana o fúngica. La muerte de los embriones ocurre a los 5 – 8 días, pero se puede requerir de varios pases para poder observar lesiones (Ley, 2003; Kleven, 2003b; Kleven, 2004).

La detección de micoplasmas por medio de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) presenta la ventaja de ser más rápido, sensible y específico (Ley, 2003; Kleven, 2003b; Kleven, 2004).

Los procedimientos serológicos son útiles para monitorear parvadas en programas de control y auxiliar en el diagnóstico cuando se sospecha de infección. La serología positiva junto con la historia clínica y los signos típicos de la enfermedad, permiten tener un diagnóstico presuntivo previo al aislamiento del organismo. Las pruebas más comunes son la aglutinación en placa (AP), la inhibición de la hemoaglutinación (HI) y el ensayo de inmunoabsorbancia ligado a enzimas (ELISA). Se recomienda realizar la prueba de HI a aves rectoras positivas a la prueba de aglutinación en placa; sin embargo, la prueba de HI requiere de mayor tiempo, no se encuentra fácilmente los reactivos y la prueba es menos sensible comparado con la prueba de ELISA (Ley, 2003; Kleven, 2003b; Kleven, 2004).

#### 2.2.9. Prevención y Control

La prevención se realiza con base a medidas higiénico-sanitarias como parte de un programa de bioseguridad. El uso de bacterinas inactivadas y emulsionadas disminuyen la transmisión vertical de los micoplasmas de campo. En fechas recientes, el uso de vacunas vivas modificadas para *M. gallisepticum* y *M. synoviae* que aunque permiten la coexistencia con las cepas de campo, no permiten la presentación clínica de la enfermedad en las aves vacunadas y



evitan la transmisión vertical de la infección (Glisson, 2003; Ley, 2003; Kleven, 2003a; Kleven, 2003b).

El control se realiza mediante la medicación con productos antimicoplásmicos como macrólidos, tetraciclinas y fluoroquinolonas. El uso de antimicrobianos reduce la severidad de las lesiones y la población de micoplasmas en el tracto respiratorio (Soto, 2001; Soto, 2002; Ley, 2003; Kleven, 2003a; Kleven, 2003b).

### **2.3. Aislamiento de *Mycoplasma spp***

#### 2.3.1. Requerimientos Nutricionales

Los requerimientos para el cultivo de *Mycoplasma spp* son tan variados que van desde los bacteriológicos hasta los cultivos celulares; dependiendo de la especie. El medio desarrollado por Frey y Col., a sido ampliamente usado en Estados Unidos y otros países para el aislamiento de *M. gallisepticum* y *M. synoviae* (Kleven, 2004).

Debido a la ausencia de pared celular en los micoplasmas, los medios usados deben contener adecuados niveles de proteína para suplir la necesidad de osmolaridad. El medio de cultivo debe ser ajustado con hidróxido de sodio para iniciar con un pH de 7.8. Debe ser preparado libre de contaminantes, normalmente introducidos por la pobre calidad de reactivos y agua del laboratorio, que pueden inactivar enzimas expuestas sobre la membrana de estos organismos. Varios micoplasmas requieren una fuente externa de esteroides y ácidos grasos, por lo que generalmente es adicionado suero de origen animal (porcino y equino). Los requerimientos de energía se encuentran en varias rutas. La glucosa puede ser procesada por una ruta glicolítica; la arginina y acetato pueden ser degradados o la urea puede ser hidrolizada. Estos tres mecanismos independientes para producir energía pueden estar unidos a un sistema respiratorio truncado que no consume oxígeno

directamente. Debido a esto, el oxígeno no es requerido para el crecimiento de micoplasmas haciéndolas anerobias facultativas (Yoder, 1990; Whitford, 1994; Kleven, 1994, Kleven, 2004).

El enriquecimiento con suero o factores del suero, debe encontrarse libre de anticuerpos contra micoplasmas, libres de antibióticos y en especial, de antimicoplásmicos, y deben de ser inactivados por calor a 56 °C por 30 minutos. Los requerimientos de suero animal, varían para cada especie de micoplasma (Yoder, 1990; Chin, 2003, Kleven, 2003a; Kleven, 2004).

No existe una formulación universal aceptada como óptima para el crecimiento de todas las especies de micoplasmas, ya que son microorganismos de difícil crecimiento que requieren un medio proteico, enriquecido con extracto fresco de levadura y azúcares como glucosa o dextrosa que es fermentada por diversas especies como son *M. meleagridis*, *M. synoviae*, *M. gallisepticum*, *M. pullorum*, *M. lipofaciens*, *M. gallinacuem*, *M. gallopavonis*, *M. columborale*, *M. glycophilum* y *M. iowae* (Yoder, 1990; Kleven, 1994).

Se incluye el rojo fenol como indicador para el cambio de pH que sucede en el medio de cultivo líquido al fermentarse algún azúcar. El medio de cultivo cambia de un color rojo hacia naranja e inmediatamente después hacia amarillo (Yoder, 1990; Kleven, 1994, Kleven, 2000; Kleven, 2004).

Algunas especies como *M. synoviae* y *M. meleagridis* requieren de NAD para su crecimiento (Kleven, 1994, Kleven, 2003b).

Los micoplasmas son resistentes a la acción del talio y de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, por lo que se sugiere agregarlos a los medios de cultivo para evitar la contaminación con otras bacterias y hongos (como acetato de talio, penicilina G potásica o ampicilina). La contaminación suele ser un problema más serio

que la baja supervivencia de los micoplasmas en las muestras (Whitford, 1994; Kleven, 1994; Kleven, 2004).

### 2.3.2. Aislamiento a partir de Muestras Clínicas

Las muestras biológicas sospechosas de contener micoplasmas deben ser remitidas al laboratorio en condiciones de humedad y en refrigeración, además de ser procesadas inmediatamente para una óptima recuperación. Debido a que los micoplasmas presentan un crecimiento complicado, se debe tener especial cuidado para minimizar la pérdida de microorganismos viables (Kleven, 2004).

Las muestras de animales vivos se limita a secreciones corporales y sitios accesibles, como orificios naturales y ojos que son tratados con hisopos. Alternativamente, los hisopos pueden ser sumergidos en caldo antes de que sean tomadas las muestras para posteriormente ser colocadas en un medio de transporte. Los empaques de hielo o cualquier otro medio debe ser incluido (Whitford, 1994, Kleven, 2004).

En animales muertos que estén en buen estado de preservación, las muestras son tomadas de órganos afectados con lesiones visibles; las muestras son flameadas con una espátula caliente para reducir la contaminación bacteriana cuando el tamaño del órgano lo permite; alternativamente, cuando el tejido es de menor tamaño se pueden sumergir en alcohol para después flamearlos y eliminar el exceso de contaminación, posteriormente se realiza un picado y macerado sobre un medio apropiado para micoplasmas (medio Frey) o solución salina fosfatada (PBS). Sin embargo, los homogenizados de tejidos pueden liberar sustancias micoplasmicidas (Whitford, 1994; Kleven, 2004).

Los hisopos usados para recolectar las muestras para cultivo deben ser siempre puestos en un medio de transporte apropiado como Amie's o Stuart,

preferiblemente medio Frey o cualquier otro que sea específico para micoplasmas. Los hisopos secos no son útiles, si no son cultivados inmediatamente después de la toma de muestra (Whitford, 1994; Kleven, 2004).

Una vez tomadas las muestras, se deben de seguir los siguientes pasos:

- Primero*, mantenerlas húmedas (en un medio de transporte adecuado);
- Segundo*, mantenerlas frías (entre 2 a 8 °C);
- Tercero*, moverse rápido (realizar el proceso de aislamiento inmediatamente).

El aislamiento de micoplasmas es maximizado si las muestras son puestas en medio Frey después de su recolección. Si se requiere demorar un día o más, o si la muestra necesita ser preservada para cultivos futuros, debe ser conservada en nitrógeno líquido o en ultracongelación ( -70 °C) (Whitford, 1994).

Durante las etapas agudas de infección (4 a 8 semanas posinfección), la población de micoplasma en el tracto respiratorio superior y la prevalencia de la infección en la parvada es alta. Por lo tanto, los hisopos traqueales o de fisura palatina de 10 a 20 aves vivas es suficiente para la recuperación del organismo (Yoder, 1990; Ley, 2003).

Para optimizar la posibilidad del aislamiento, las parvadas deben ser muestreadas antes de iniciar una terapia antimicrobiana (Ley, 2003).

Una vez recibida la muestra en el laboratorio, debe ser sembrada inmediatamente en una base de agar apropiada. Para incrementar la probabilidad de aislamientos, una parte de la muestra es sembrada en agar; mientras otra parte, es incubada en medio líquido. Los pases de caldo a caldo pueden incrementar los resultados. Se deben realizar varios intentos para la

recuperación, cuando se trata muestras con un bajo número de organismos (Whitford, 1994; Ley, 2003; Kleven, 2004).

En los aislamientos primarios, pueden estar presente toxinas y anticuerpos, por lo tanto, se recomienda hacer transferencia de un inóculo pequeño dentro de las primeras 24 horas, o hacer diluciones seriadas hasta  $10^{-3}$  del inóculo en caldo. La transferencia es hecha con una pipeta usando un 10% del inóculo (Whitford, 1994; Kleven, 2003b; Kleven, 2004).

Las placas inoculadas se deben incubar a 37 °C en una atmósfera húmeda y puede requerir de al menos 3 a 7 días de incubación para que las colonias típicas sean suficientemente grandes para ser observadas con microscopio estereoscópico (Yoder, 1990; Ley, 2003; Kleven, 2003b).

Los medios sólidos ayudan a la detección de colonias de lento crecimiento que pueden ser ocultadas por especies saprofitas en caldo. El incremento en la humedad y tensión de CO<sub>2</sub> se ha reportado que pueden incrementar el aislamiento, éstas condiciones se pueden alcanzar con el uso de papel humedecido y la colocación de una vela en el contenedor o usando sistemas específicos. Las placas son observadas buscando la presencia de colonias de micoplasma usando un microscopio indirecto o de baja intensidad de iluminación con una magnificación aproximada a 30X. Los cultivos de material de campo no deben ser descartados como negativos, hasta pasado por lo menos, 20 días de incubación (Kleven, 2003b; Kleven, 2004).

Los caldos deben ser examinados diariamente por cambios de acidez de rojo a naranja. Cualquier cambio evidente, debe ser sembrado en medios sólidos. Aun, cuando no ocurra cambio de coloración, la siembra en medio sólido debe hacerse entre los días 7 y 10 o antes, debido a la presencia de especies que hidrolizan la arginina con la producción de un medio alcalino y que enmascaren

la presencia de cambios de coloración por parte de especies fermentadoras de glucosa (Kleven, 2004).

El crecimiento óptimo en medios líquidos ocurre a un pH de 7.8. Los cultivos incubados por más de unas cuantas horas posteriores al cambio de coloración (pH menor a 6.8) disminuyen la viabilidad del organismo. Generalmente el crecimiento es evidente, por el cambio de coloración del medio, desde los 3 a los 5 días de incubación; sin embargo, algunos aislamientos de campo requieren más tiempo y múltiples pases. Si el crecimiento no es evidente, el realizar 2 a 3 pases seriados entre los días 5 y 7 puede incrementar el número de aislamientos (Ley, 2003; Kleven, 2003b).

Se puede mejorar el aislamiento específico de *M. synoviae* y *M. gallisepticum*, mediante el agregado de alícuotas de antisueros contra las especies saprofitas de micoplasmas más comunes del tracto respiratorio (*M. gallinarum* y *M. gallinaceum*) y que por su rápido crecimiento (24 horas) dificultan el desarrollo de *M. synoviae* y *M. gallisepticum* que requieren de 4 a 6 días (Cerde, 1998).

Para la identificación de las especies se puede hacer por métodos bioquímicos como la fermentación de glucosa, hidrólisis de arginina y actividad de fosfatasa (Cuadro 3). Sin embargo, no permite realizar una identificación apropiada debido a la similitud entre las especies. Los métodos más usados y recomendados para la identificación de los aislamientos son por inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa y por PCR (Kleven, 2004).

Cuadro 3. Características bioquímicas de los micoplasmas aviare

Especie	Hospedador	Fermentación de glucosa	Hidrólisis de arginina	Actividad de fosfatasa
<i>M. gallinarum</i>	Gallinas	-	+	-
<i>M. iners</i>	Gallinas	-	+	-
<i>M. gallinaceum</i>	Gallinas	+	-	-
<i>M. glycyphilum</i>	Gallinas	+	-	+ / -
<i>M. pullorum</i>	Gallinas	+	-	-
<i>M. lipofaciens</i>	Gallinas	+	+	-
<i>M. synoviae</i>	Gallinas y Pavos	+	-	-
<i>M. gallisepticum</i>	Gallinas, Pavos y otros	+	-	-
<i>M. anseris</i>	Gansos	-	+	-
<i>M. columbinasale</i>	Palomas	-	+	-
<i>M. columbinum</i>	Palomas	-	+	-
<i>M. columborale</i>	Palomas	+	-	-
<i>M. anatis</i>	Patos	+	-	+
<i>M. meleagridis</i>	Pavos	-	+	+
<i>M. gallopavonis</i>	Pavos	+	-	-
<i>M. iowae</i>	Pavos	+	+	-
<i>M. cloacale</i>	Pavos y Gansos	-	+	-
<i>M. laidlawii</i>	Varios	+	-	+ / -

Kleven, 1994

### III. Justificación del Estudio

En la industria avícola, el efecto económico que presentan los micoplasmas es muy elevado debido a la medicación y control de la enfermedad. Las herramientas de diagnóstico más utilizadas están basadas en pruebas serológicas (inhibición de la hemoaglutinación y ELISA) en donde solamente se puede cuantificar anticuerpos específicos contra la enfermedad; éstas pruebas presentan la limitación de no poder confirmar la presencia de *Mycoplasma spp*, ya que el diagnóstico es indirecto. Actualmente, se cuenta con el diagnóstico molecular de *Mycoplasma spp* por medio de PCR donde se detecta específicamente el material genético del microorganismo. La prueba destaca por su alta sensibilidad y especificidad, y por ser una prueba rápida con relación a otras. Sin embargo, presenta un costo elevado y requiere de una inversión tecnológica con la que muchos laboratorios no cuentan. A nivel bacteriológico, Kleven (1994) menciona que el aislamiento bacteriano es la prueba estándar para realizar el diagnóstico de *Mycoplasma spp*; con la posibilidad de realizar otras pruebas como la sensibilidad a antimicrobianos, la identificación de diferentes especies de *Mycoplasma spp* y la elaboración de “bacterinas” específicas para contrarrestar los problemas que pueda ocasionar la cepa presente en una granja (Etcharren, 1992; Pérez, 1993; Soto, 2001; Valladares, 2002).



Los micoplasmas presentan un metabolismo lento, por lo que el crecimiento se ve afectado por el tiempo de incubación. Dentro del procedimiento para el aislamiento se recomienda realizar la siembra directa en placa de la muestra original y autores como Ley y Kleven sugieren realizar una incubación de muestras originales durante un periodo de hasta 7 días en caldo, previo a la siembra en agar para aumentar la tasa de aislamientos de *Mycoplasma spp* (Whitford, 1994; Kleven, 1994; Kleven, 2004).

## IV. Hipótesis y Objetivos

### 4.1. Hipótesis

#### 4.1.1. Hipótesis general

Al realizar diferentes tiempos de incubación a partir de cultivos primarios en medio líquido de hisopos traqueales se obtienen diferentes tasas de crecimiento de *Mycoplasma spp* presentes en gallinas comerciales.

#### 4.1.2. Hipótesis específicas

- a) Al realizar una previa incubación de cultivo primario de hisopos traqueales en medio líquido se obtiene crecimiento de *Mycoplasma spp* en siembras de agar.
- b) Al realizar una previa incubación de 2 a 3 días de cultivo primario se obtiene una tasa óptima de crecimiento de *Mycoplasma spp* en siembras realizadas en agar.

### 4.2. Objetivos

#### 4.2.1. Objetivo general

Evaluación del efecto de incubación en 4 tiempos (días) para la obtención de aislamientos de *Mycoplasma spp* realizados a partir de cultivo primario en medio líquido de hisopos traqueales de gallinas comerciales.

#### 4.2.2. Objetivos específicos

- a) Evaluar la frecuencia de crecimiento obtenida de aislamientos de *Mycoplasma spp* en 4 tiempos de incubación a partir de cultivos primarios.
  
- b) Estimar la tasa óptima de crecimiento de *Mycoplasma spp* con base a 4 tiempos de incubación de hisopados traqueales en cultivo primario.

## V. Materiales y Métodos

### 5.1. Selección de aves en estudio

Se realizó un muestreo a 100 gallinas comerciales de estirpe Hy-Line de 42 semanas de edad pertenecientes a una sola granja localizada en el municipio de Tehuacan, Pue.

La selección de aves que fueron muestreadas, se realizó con base a los siguientes criterios:

- a) Criterios de Inclusión en el muestreo: aves mayores de 40 semanas de edad.
- b) Criterios de exclusión:
  - Aves que estén sometidas a medicación específica contra micoplasmas.
  - Aves inmunizadas con vacunas vivas de micoplasmas.
  - Aves muertas.

### 5.2. Metodología de toma de muestra

#### 5.2.1. Material utilizado para la toma de muestras:

- a) Se utilizaron hisopos con mango de madera y algodón, con un diámetro de 3 mm y esterilizados por medio de autoclave a 121 °C /15 lb/15 min (Kleven, 1994a; Zain, 1995).

- b) Tubos de cultivo celular estériles (NUNC) con 3 ml de medio Frey conteniendo Penicilina 2,000 UI/ml y acetato de talio 0.2% con el propósito de evitar crecimiento de diferentes tipos de bacterias y hongos (Anexo II).

#### 5.2.2. Descripción del muestreo realizado a las aves

Para cada ave viva se requirieron de dos personas: una para sujetar el ave; mientras otra persona toma la muestra de la siguiente manera:

- a) Se tomó un hisopo estéril y se introdujo en el tercio superior de la tráquea del ave, evitando tocar las paredes de la cavidad oral.
- b) El hisopo fue depositado inmediatamente en el tubo que contenía el medio Frey líquido.
- c) El hisopo se agitó vigorosamente dentro del medio, y posteriormente fue desechado. Esto, con el objeto de dejar la muestra obtenida de tráquea en el medio Frey.

El tubo con la muestra, inmediatamente fue tapado, identificado y refrigerado entre 2 y 8 °C. Cabe mencionar que la identificación se realizó con un marcador de tinta indeleble, indicando el número consecutivo de muestreo y la fecha de muestreo.

#### 5.2.4. Transporte y conservación de muestras

Una vez tomadas las muestras en medio Frey líquido (considerado como cultivo primario), estas fueron conservadas en una caja térmica con tapa, utilizando geles refrigerantes para mantener las muestras en condiciones de frío y transportadas inmediatamente al laboratorio.

### 5.3. Metodología de aislamiento

En condiciones de esterilidad, se realizaron siembras de cada uno de los cultivos primarios, utilizando una asa bacteriológica. Individualmente, la siembra se realizó en placa con medio Frey sólido mediante estría continua.

Después de realizadas las siembras, los cultivos primarios fueron incubados a 37 °C durante 15 días. Durante este periodo de incubación, se realizaron siembras del mismo en 4 tiempos:

*Tiempo 1:* Primera siembra, realizada en el momento que iniciaba la incubación del cultivo primario y considerado como día 0 de incubación.

*Tiempo 2.* Segunda siembra, realizada a los 5 días de incubación del cultivo primario.

*Tiempo 3.* Tercera siembra, realizada a los 10 días de incubación del cultivo primario. y,

*Tiempo 4.* Cuarta siembra, realizada a los 15 días de incubación del cultivo primario.

Las placas sembradas fueron depositadas en una jarra *GasPack*<sup>®</sup> *System* (Mca. BBL) e incubadas a 37 °C durante 21 días.

Para determinar si existía crecimiento de *Mycoplasma spp* en las placas, estas fueron observadas por microscopía estereoscópica (Mca. *Leica*; Mod. Sterezoom 2000 Z-45L) durante los 21 días de incubación e identificando la morfología típica de *Mycoplasma spp* (colonias redondas, con bordes regulares y una zona circular densa localizada en el centro de la colonia).

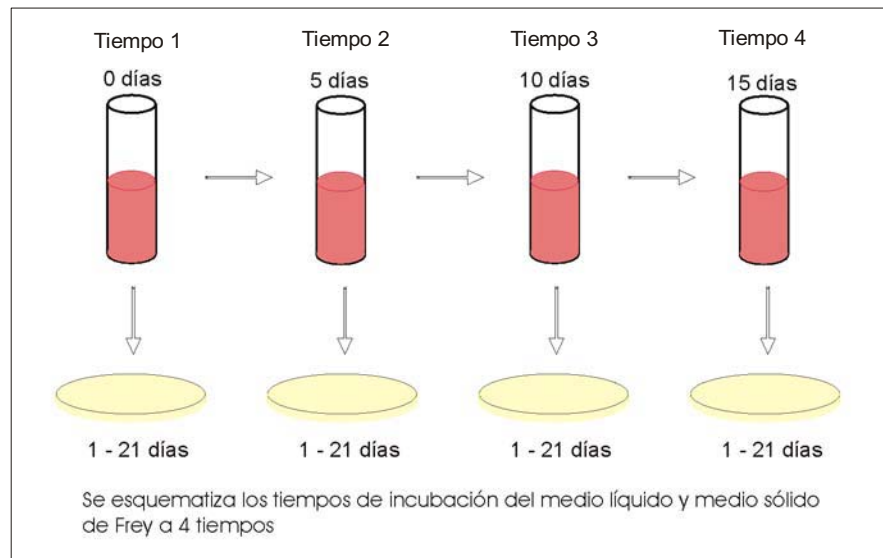


Imagen 1. Procedimiento de aislamiento a 4 tiempos.

#### 5.4. Análisis estadístico

Se utilizó el siguiente modelo factorial

100 muestras X 4 tiempos de siembra

Siendo:

- Muestras: 100 hisopos traqueales de 100 gallinas muestreadas
- Tiempos: Siembras en placa en 4 tiempos en días: 0, 5, 10 y 15 días de incubación de cultivo primario.

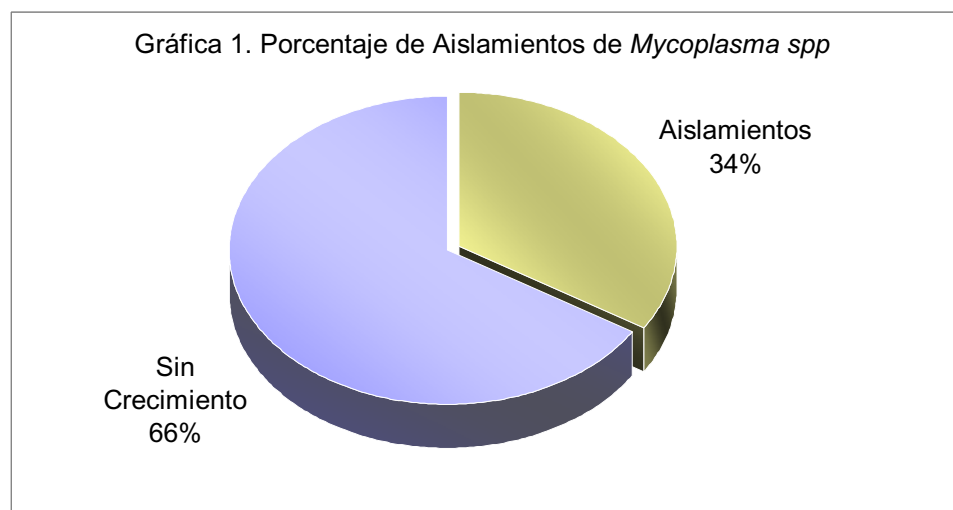
Para la interpretación de resultados se realizaron análisis estadísticos descriptivos e inferenciales a través de la prueba “t” de estudiante (*Student “t”*) utilizando el paquete estadístico SPSS Versión 14.

## VI. Resultados

Con base a los 100 cultivos primarios realizados a partir de los 100 hisopos traqueales de aves comerciales, únicamente se obtuvieron 34 aislamientos de *Mycoplasma spp* en los 4 tiempos de incubación durante los 36 días totales de incubación de cultivos primarios, obteniendo una tasa de recuperación del 34% y en el 66% restantes no se observó crecimiento (Cuadro 4 y Gráfica 1). La identificación de aislamientos de *Mycoplasma spp* fue con base a la forma de colonias redondas con zona circular densa en el centro (Anexo IV).

Cuadro 4. Total de aislamientos de *Mycoplasma spp* obtenidos

Aislamientos	34	34%
Sin Crecimiento	66	66%
<b>Total de muestras</b>	<b>100</b>	<b>100%</b>

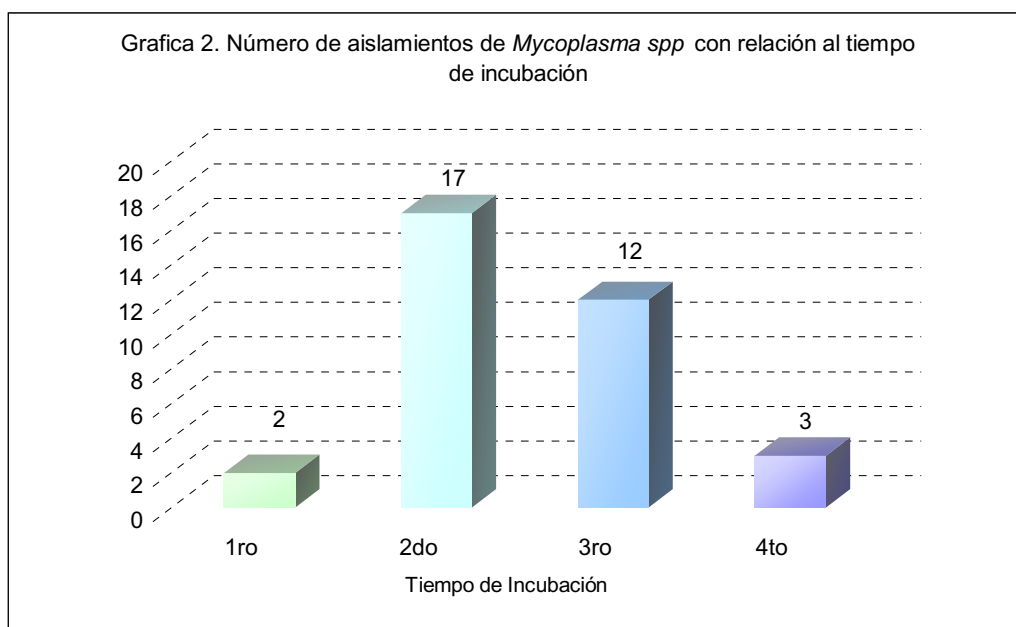




Considerando únicamente los 34 aislamientos (100 %) obtenidos en los 4 tiempos de siembra, se observó que al realizar una siembra en el tiempo 1 (día 0) donde inicia la incubación del cultivo primario, se obtuvo el 5.9% de aislamientos. En el tiempo 2 se observa el mayor número de aislamientos, siendo el 50%. En el tiempo 3 se observa un menor número de aislamiento con relación al tiempo 2 en un 35.3%; y en el tiempo 4 el número de recuperación es similar al tiempo 1, siendo en un 8.8% (Cuadro 5 y Grafica 2).

Cuadro 5. Aislamientos de *Mycoplasma spp* obtenidos en los 4 tiempos de incubación de cultivo primario

Tiempos de Incubación	Número de Aislamientos	Porcentaje
Tiempo 1 (Día cero de incubación del cultivo primario)	2	5.9%
Tiempo 2 (Día 5 de incubación del cultivo primario)	17	50.0%
Tiempo 3 (Día 10 de incubación del cultivo primario)	12	35.3%
Tiempo 4 (Día 15 de incubación del cultivo primario)	3	8.8%
<b>Total de Aislamientos</b>	<b>34</b>	<b>100%</b>



---

En el tiempo 1, el cultivo primario presentó un cambio de pH (coloración de rojo a amarillo) en las dos muestras que presentaron crecimiento en placa, mismo que se mantuvo durante los 15 días de incubación del cultivo, no viendo el mismo efecto en los 98 cultivos primarios restantes donde no hubo crecimiento. Considerando los dos aislamientos obtenidos, se observó que en promedio se requirió de 4.5 días para obtener crecimiento en placa con un rango de 4 a 5 días y con una desviación estándar de 0.70711 (Cuadro 6 y 7; Gráfica 3 y 4).

En el tiempo 2, se observó aislamiento en 17 muestras donde 9 presentaron cambio de coloración en cultivo primario (pH: rojo a amarillo) y en las 8 muestras restantes no hubo cambio de coloración, pero si presentaron crecimiento de *Mycoplasma spp.* No sucediendo lo mismo con las 83 muestras restantes donde no se observó crecimiento incluyendo los dos cultivos primarios con crecimiento en el tiempo 1. Con relación al tiempo de crecimiento en placa, se observó que se requirieron en promedio 4.6 días con un rango de 2 a 6 días y una desviación estándar de 1.17574 (Cuadro 6 y 7; Gráfica 3 y 4).

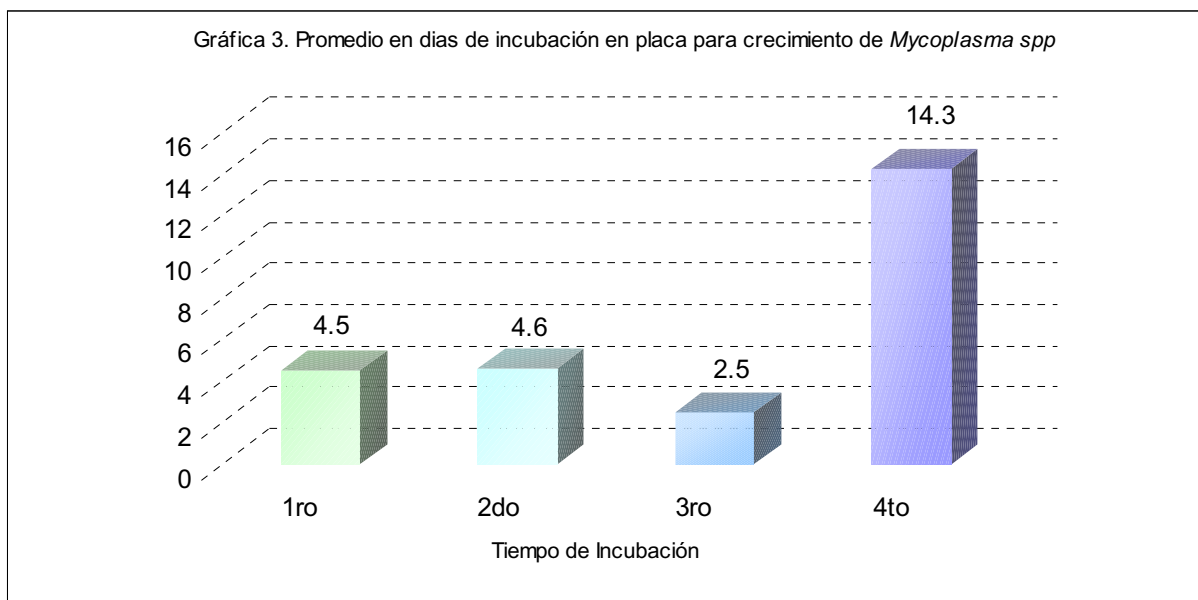
En el tiempo 3, se obtuvieron 12 aislamientos, dentro de los cuales, en 3 cultivos primarios hubo efecto de cambio de pH (rojo a amarillo) y en los 9 restantes no hubo el mismo efecto pero si hubo crecimiento de *Mycoplasma spp.* En este tiempo considerando 88 cultivos primarios, no hubo cambio de coloración y crecimiento (incluyendo los dos cultivos primarios del primer tiempo y los 9 del segundo tiempo donde hubo el efecto de cambio de color). Con base a tiempo estimado de crecimiento, se observó que en promedio se requirieron 2.5 días para obtener crecimiento en placa con un rango de 2 a 4 días con una desviación estándar de 0.90453 (Cuadro 6 y 7; Gráfica 3 y 4).

En el tiempo 4, se obtuvieron únicamente tres aislamientos y solamente uno de estos, presentó el efecto de cambio de pH (rojo a amarillo). Es de considerar que en este tiempo fueron necesarios mucho más días para obtener crecimiento en placa con un promedio de 14.3 días, valor que supera

mayoritariamente a los tiempos 1, 2 y 3 con un rango de 11 a 17 días y una desviación estándar de 3.05505 (Cuadro 6 y 7; Gráfica 3 y 4).

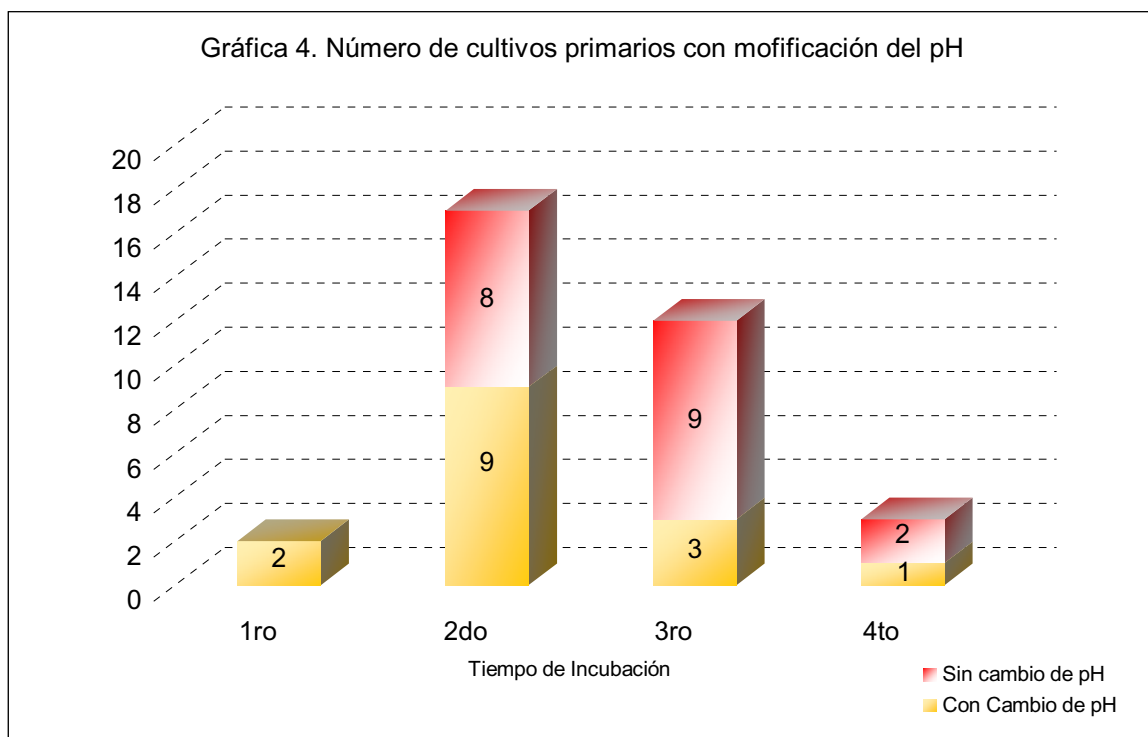
Cuadro 6. Días de incubación requeridos para presentar crecimiento de colonias de *Mycoplasma spp* en placa

Tiempo de Incubación	Días de Incubación para obtener crecimiento en placa de <i>Mycoplasma spp</i>	
	Rango	Promedio
Tiempo 1 (0 días de incubación)	4 – 5	4.5
Tiempo 2 (5 días de incubación)	2 – 6	4.6
Tiempo 3 (10 días de incubación)	2 – 4	2.5
Tiempo 2 (15 días de incubación)	11 – 17	14.3



Cuadro 7. Muestras con cambio de pH en medio líquido

Tiempo de Siembra	Identificación de cultivos primarios	No. de Muestras
Tiempo 1 (0 días de incubación)	5, 33	2
Tiempo 2 (5 días de incubación)	3, 28, 46, 54, 62, 66, 86, 93, 99	9
Tiempo 3 (10 días de incubación)	31, 42, 82	3
Tiempo 4 (15 días de incubación)	53	1



En general, podemos observar que los tiempos 2 y 3 son los que presentan un mayor número de aislamientos de *Mycoplasma spp*, que en los tiempos 1 y 4. Considerando los tiempos 2 y 3, se observó que en el tiempo 2 se obtiene el mayor número de aislamientos (17), sin embargo, al sembrar en placa presenta un tiempo estimado de 4.5 días para poder identificar las colonias de micoplasmas. No obstante, en el tiempo 3 donde se presentaron 12

aislamientos, se observó que al realizar siembras a los 10 días previa incubación del cultivo primario, presentan un crecimiento de micoplasmas en promedio de 2.5 días, siendo un valor más bajo que el estimado en el tiempo 2.

También se observó que la desviación estándar con relación a los promedios en días de crecimiento de *Mycoplasma spp* en los 4 tiempos, son más bajos en el tiempo 1, seguido del tiempo 3; y los más altos en los tiempos 2 y 4. Esto se debe a que los valores del tiempo 1 aunque son únicamente 2 aislamientos, el tiempo estimado en crecimiento de micoplasma es casi igual en los dos aislamientos (un día de diferencia); lo contrario a lo observado en el tiempo 4 donde se presentaron 3 aislamientos, pero los valores estimados de crecimiento son diferentes, variando entre 2 y 6 días de diferencia (Cuadro 8).

Con relación a la desviación estándar de los tiempos 2 y 3 donde se encontraron los mayores números de aislamientos, presentaron una duración de crecimiento similar con una variación entre 2 a 4 días. Por lo que, al realizar el análisis inferencial entre los tiempos de incubación de cultivos primarios previos a realizar siembras de los mismos para obtener un mayor número de aislamientos de micoplasmas, se observó que los mejores tiempos son 2 y 3, es decir de 5 a 10 días previos de incubación con relación a el tiempo 1 donde no hubo una incubación previa y el tiempo 4 con una incubación previa de 15 días, datos que se comprueban estadísticamente con una diferencia de  $p < .05$  (Cuadro 9). Sumado a esto, se observó que el tiempo 3 (promedio: 2.4 días) es diferente al tiempo 1, pero no al tiempo 2, y diferente también con relación al tiempo 4, corroborando los valores con base a los encontrados durante el desarrollo del estudio.

Cuadro 8. Valores descriptivos

	Tiempo 1	Tiempo 2	Tiempo 3	Tiempo 4
Valido	2	17	12	3
Promedio	4.5000	4.5882	2.5000	14.3333
Desviación Estandar	0.70711	1.17574	0.90453	3.05505
Varianza	0.500	1.382	0.818	9.333

Cuadro 9. Prueba "t" de estudiante (*Student "t"*) para conocer el comportamiento entre tiempos de incubación

	Valor de Prueba $p \leq .05$			
	t	gl	Sig.	Diferencia de promedio
Tiempo 1	9.000	1	0.070	4.50000
Tiempo 2	16.090	16	0.000	4.58824
Tiempo 3	9.574	11	0.000	2.50000
Tiempo 4	8.126	2	0.015	14.33333

## VII. Discusión

Los micoplasmas son conocidos como bacterias de difícil crecimiento, debido a sus características biológicas, dentro de las que destacan la inhabilidad de sintetizar una pared bacteriana, un potencial genético limitado y un requerimiento nutricional muy complejo generando dificultades para realizar su aislamiento y su reproducción *in vitro*; tales características han sido descritas por Yoder (1990), Holt (1994), Rosenbusch (1994) y Kleven (1994); debido a esto, las tasas de recuperación suelen ser bajas como lo menciona Cerda (1998) al obtener 23 aislamientos de 108 muestreos (21.2%) y como lo encontrado en el presente estudio, donde se obtuvo una tasa del 34% de aislamientos.

Whitford (1994) y Kleven (2004) coinciden en que para incrementar la probabilidad de los aislamientos una parte debe ser sembrada en placa, mientras que otra parte, debe incubarse en medio líquido, además se deben realizar varios intentos para la recuperación, si se trata con un bajo número de organismos viables.

Con base a los procedimientos realizados en el estudio, se observó que en el Tiempo 1 se obtuvieron 2 aislamientos (2% de 100 muestras, 5.9% de 34 aislamientos); con un promedio de crecimiento en placa de 4.5 días, resultados que coinciden con lo señalado por Kleven y Ley (2003) donde hacen referencia a que el crecimiento en placa se presenta entre los 3 y 7 días de incubación. Sin embargo, se observó que el porcentaje de aislamientos en este tiempo fue muy bajo, lo cual puede deberse principalmente a:

- Un lento metabolismo y una estrecha relación con la superficie celular, por lo que requiere realizar una adaptación al medio de cultivo.
  
- Una baja carga de partículas viables para presentar crecimiento en placa.

Esto ha sido observado, principalmente por Kleven (1994, 2003b), al hacer referencia a cepas de lento crecimiento que requieren de varios intentos para poder obtener crecimiento; así como, cuando se trata con un bajo número de organismos viables provenientes de la muestra.

En el Tiempo 2, se obtuvieron 17 aislamientos (17% de 100 muestras, 50% de 34 aislamientos); y en el Tiempo 3, 12 aislamientos (12% de 100, y 35.3% de 34 aislamientos). En ambos tiempos, se obtuvo el mayor número de aislamientos; por lo que al realizar una incubación del cultivo primario de 5 a 10 días, los aislamientos se ven maximizados. Los estudios realizados por Yoder (1990), Kleven (2003b) y Ley (2003) coinciden en que un cultivo inicial en caldo es un método mas sensible para el aislamiento.

Para maximizar los aislamientos de micoplasmas, Kleven y Ley (2003) sugieren realizar incubaciones de hasta 7 días en medios líquidos, y por su parte Kleven (2003b) menciona que la incubación en medio líquido es más sensible, constatado por la diferencia obtenida de 2% de aislamientos obtenidos sin una previa incubación (Tiempo 1, siendo día 0) y del 32% de aislamientos obtenidos a partir de previas incubaciones del cultivo primario en medio líquido (Tiempo 2, 3 y 4, correspondientes a los días 5, 10 y 15).

En general, se pudo observar que durante los 4 tiempos de incubación de los cultivos primarios, se obtuvieron aislamientos de micoplasmas, esto pudo deberse a que existen diferentes tipos de cepas de micoplasmas donde se pueden incluir de rápido y de lento crecimiento que pueden infectar a la vez, a



una misma ave, como lo indica Kleven, 1994. También se ha observado que el crecimiento de especies con un metabolismo rápido no patógenas (24 horas) puede inhibir el crecimiento de especies patógenas de lento crecimiento (6 días) como también lo menciona Kleven (Citado por Cerda, 1998).

Específicamente con relación al tiempo 4, se observó que la tasa de recuperación de micoplasmas fue del 3%, requiriendo como mínimo 11 días y un máximo de 17 días de incubación en placa para presentar crecimiento. En este tiempo, se deduce que los medios sólidos ayudan a la detección de cepas de lento crecimiento y a la viabilidad para una adaptación requerida, como lo mencionan Withford y Kleven (1994) indicando que al realizar varios intentos, permite el crecimiento de especies que presentan un metabolismo lento o cuando se encuentra una baja población de partículas viables provenientes del hisopado. Así mismo, Kleven (1994, 2003) indica que es necesario dejar la incubación de placas hasta 20 días, como hace referencia para obtener micoplasmas de lento crecimiento.

Por otra parte, se observó que algunos de los medios líquidos de cultivos primarios cambiaban de color rojo a color amarillo, algunos cultivos al inicio y otros conforme pasaba el tiempo de incubación; lo cual, se debió a la modificación del pH, reacción principalmente causada por el rojo de fenol que contenían los medios como un indicador de cambio de pH. Es decir, con base al metabolismo de los micoplasmas, al fermentarse la glucosa se genera principalmente ácido láctico con la consecuente disminución del pH. Dentro de las especies que fermentan la glucosa se encuentran *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. galisepticum*, *M. lipofasciens*, *M. glycyphilum*, *M. gallinaceum* y *M. pullorum* presentes en gallinas (Poder, 1990; Holt, 1994; Rosenbusch, 1994; Kleven, 1994; Whitford, 1994).

También, debido a que los micoplasmas carecen de pared celular, se ve aumentada la sensibilidad a los cambios de pH, explicando el por qué no se

obtuvo crecimiento en los medios que presentaron este efecto en el cultivo primario. Ley y Kleven (2003) mencionan que el cambio de coloración es evidente entre los 3 y 5 días de incubación en medio líquido, no obstante, existen aislamientos de campo que pueden requerir más tiempo y pases múltiples. Por su parte, Ley (2003) hace referencia que la viabilidad de los micoplasmas puede disminuirse a causa de que los cultivos incubados por más de unas cuantas horas posteriores al cambio de pH del medio (pH menor a 6.8).

Uno de los principales puntos encontrados en el presente estudio, es que se observó que existe un efecto positivo en la incubación del cultivo primario al obtener un mayor número de aislamientos en los tiempos 2 y 3; no encontrando diferencia significativa en el tiempo de incubación de placas para observar crecimiento de colonias en ambos tiempos, aunado en el tiempo 1, ya que presentan un rango similar a diferencia del tiempo 4, donde se observa un mayor tiempo en días de incubación para presentar crecimiento.

## VIII. Conclusiones y Recomendaciones

### **Conclusiones**

- La micoplasmosis aviar es considerada como la infección bacteriana más costosa en la industria avícola, presentando una alta morbilidad (100%), una mortalidad hasta del 30%, retraso en el crecimiento, aumento de animales de desecho (15%), disminución de la fertilidad (10%), disminución en la producción de huevo de 25 huevos por gallina por ciclo y aunado a que las aves quedan como portadoras durante toda su vida. Por lo que, al realizar adecuadamente su diagnóstico permitirá diseñar las estrategias adecuadas para su control y prevención y de esta manera, disminuir los elevados costos que produce la presencia de micoplasmosis.
  
- El crecimiento *in vitro* de micoplasmas se ve afectado principalmente por la calidad de los medios de cultivo y por la contaminación bacteriana y fúngica, además, de compuestos químicos que pueden interactuar con proteínas de la membrana celular, toxinas y sustancias micoplasmicidas que inhiban el crecimiento bacteriano, así como, a la alta sensibilidad que poseen a los gradientes osmóticos y de pH.
  
- La clave para el aislamiento de micoplasma depende en gran medida de la calidad del medio de cultivo, ya que éste debe contener componentes que cumplan con las necesidades nutricionales del organismo.
  
- Se observa que la incubación presenta un efecto para aumentar la tasa de aislamientos a partir de muestras clínicas.

- Como se observa en los resultados, la inoculación directa presenta solamente un 2% en la tasa de recuperación, mientras que al realizar una incubación previa del cultivo primario de 5 días, se obtuvo una tasa del 34% como sugieren Kleven y Ley (2003).
- El efecto de una incubación previa de los cultivos primarios antes de realizar siembras para el aislamientos de micoplasmas es importante, ya que requieren de un tiempo de adaptación en medio para aumentar el número de organismos viables, mientras que al realizar una siembra en placa sin una previa incubación, la cantidad de organismos llega a ser mucho menor, aunado a que el medio de cultivo líquido es un método mas sensible para el aislamiento mencionado por Kleven (2003b).
- Al evaluar el efecto de la incubación del cultivo primario se observa que al incubar durante 5 días (tiempo 2) se obtuvo un mayor número de aislamientos 17% y a los 10 días (Tiempo 3) con el 12%.
- El medio Frey 2X (doble concentración de penicilina y acetato de talio) permite el mantenimiento del medio de cultivo durante un largo tiempo para inhibir la contaminación por otros organismos diferentes a micoplasmas.

### ***Recomendaciones***

- Se recomienda el uso de siembras en placa a partir del cultivo primario a los 0, 5, 10 y 15 días de incubación, si no hay cambio de pH. Si existe cambio, se sugiere realizar la siembra al momento de la modificación de pH y hacer diluciones seriadas a partir del cultivo primario.
- Se consideran las muestras como negativas si no se obtiene crecimiento posterior a los 15 días de incubación del cultivo primario más 21 días de

incubación de medio sólido; por lo que el rango para obtener un aislamiento de *Mycoplasma spp* es de 3 a 36 días.

- El diagnóstico de *Mycoplasma spp* por medio del aislamiento permite un mejor control de la enfermedad, debido a que a partir de éste se puede realizar pruebas de sensibilidad a antimicrobianos mediante la microdilución propuesta por Soto (2002) y la obtención de cepas para la elaboración de autovacunas endémicas de la región o de la granja. Con esto los costos del control se pueden optimizar obteniendo mejores resultados.
- Mediante el aislamiento se pueden detectar varias especies de micoplasmas, que por otros métodos no sería posible o práctico, ya que especies como *M. gallinarum* pueden inducir procesos infecciosos junto a vacunación de Newcastle.
- Se recomienda realizar nuevamente el protocolo, considerando la identificación de especies. Además, se sugiere realizar diluciones seriadas  $10^{-3}$  a partir del cultivo primario y el uso de antisueros específicos contra otros micoplasmas.
- La identificación de especies a partir de aislamientos, se debe realizar mediante los inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa y/o PCR.
- El uso de antisueros específicos para micoplasmas saprofitos puede maximizar el aislamiento de especies patógenas como *M. gallisepticum* y *M. synoviae*.

---

## Literatura Citada

Bradbury, J. M.; S. H. Kleven. 2003. ***Mycoplasma iowae* Infection**. Disease of Poultry. Décimo primera edición. Editado por H. J. Barnes, J. R. Glisson, A. M. Fadly, L. R. McDougald, D. E. Swayne. Iowa State University Press: 766-771.

Chin, R. P.; Ghazikhanian G. Y.; I. Kempf. 2003. ***Mycoplasma meleagridis* Infection**. Disease of Poultry. 11<sup>th</sup> edition. Edit. H.J. Barnes, J.R. Glisson, A. M. Fadly, L. R. McDougald, D. E. Swayne. Iowa State University Press: 744-756.

Etcharren, L. A.; Rodríguez, L. M.; M. A. Cenicerós. 1992. **Aislamiento de *Mycoplasma synoviae* y *Mycoplasma gallisepticum* de aves comerciales en México, identificados mediante inmunofluorescencia directa**. Memorias de la decimoséptima Convención Anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México, A. C. (ANECA), México: 85-87.

Glisson, J. R. 2003. **Las enfermedades respiratorias del pollo de engorda**. Memorias del decimoquinto Curso Avimex de Salud y Productividad "Enfermedad Respiratoria Multicausal de las Aves". México: 16-19.

Holt, J. G.; Krieg, P.; Sneath, H. A.; Stanley, J. T.; S. T. Williams. 1994. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Novena edición. Williams & Wilkins: 705-717.

Kleven, S. H. 1994. **Avian Mycoplasmas**. Mycoplasmosis in animals: Laboratory diagnosis. Editado por H. W. Whitford, R. F. Rosenbush y L. H. Lauerman. Recopilado por el Micoplasmosis Committee of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians. Iowa State University Press: 31-38.

Kleven, S. H. 2000. **Biology of Mycoplasmas**. Manual of Mycoplasma Diagnostic Workshop. Poultry Diagnostic and Research Center, University of Georgia. Edit. University of Georgia, Poultry Diagnostic Research Center and the United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, National Poultry Improvement Plan: 1-22

Kleven, S. H. 2003a. Disease of Poultry: **Mycoplasmosis**. Décima primera edición. Editado por H. J. Barnes, J. R. Glisson, A. M. Fadly, L. R. McDougald, D. E. Swayne. Iowa State University Press: 79-721.

Kleven, S. H. 2003b. ***Mycoplasma synoviae* Infection**. Disease of Poultry. Edic. 11; Edt. H. J. Barnes, J. R. Glisson, A. M. Fadly, L. R. McDougald, D. E. Swayne. Iowa State University Press: 756-766.

---

Kleven, S. H. 2003c. **Other Mycoplasmal Infections**. Disease of Poultry. Décimo primera edición. Editado por H. J. Barnes, J. R. Glisson, A. M. Fadly, L. R. McDougald, D. E. Swayne. Iowa State University Press: 772-774.

Kleven S.H.; Jordan F.T.W.; Bradbury J.M. 2004. OIE Manual of Diagnostics Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees): **Avian Micoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*)**. Chapter 2.7.3. 5<sup>th</sup> Edition. OIE; Vol.2: 842-855

Ley, D. H.; H. W. Yoder. 2003. ***Mycoplasma gallisepticum* Infection**. Disease of Poultry. Décimo primera edición. Editado por H.J. Barnes, J.R. Glisson, A.M. Fadly, L. R. McDougald, D.E. Swayne. Iowa State University Press: 722-744.

Pérez M. A., Ibarra, J.C., V. Pérez. 1993. **El aislamiento como alternativa para confirmar el diagnóstico de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae***. Memorias de la decimotercera Convención Anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México, A. C. (ANECA), México: 96-204.

Rosenbusch, R. F. 1994. Mycoplasmosis in animals: Laboratory diagnosis: **Biology and Taxonomy of the Mycoplasmas**. Edit. H. W. Whitford, R. F. Rosenbush and L. H. Lauerman. Recopilated for Micoplasmosis Committee of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians. Edic. 1a. Iowa State University Press: 3-11.

Soto, P. E. 2002. **Desarrollo del método de microdilución para la detección de la susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* hacia *Mycoplasma synoviae***. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma de Nayarit.

Soto, P. E.; Lozano, B.; Sarfati, D. 2001. **Micoplasmosis en la avicultura moderna**. Memorias del decimotercer Curso Avimex de Salud y Productividad "Respuestas a las patologías críticas en la avicultura moderna". México: 53-64.

Unión Nacional de Avicultores. Dirección de estudios económicos. 2004. **Compendio de Indicadores Económicos del Sector Avícola 2003-2004**, Abril. México: 87-89

Valladares, J.C.; Angulo, E.; Barrientos, B.; Juárez, D.; A. Lara. 2002. **Productividad y respuesta serológica de reproductoras con exposiciones vacunales y/o de campo a *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae***. Memorias de la vigésimo séptima Convención Anual de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México, A. C. (ANECA), y quincuagésimo primera Convención de la Western Poultry Disease Conference (WPDC), México: 2002.

Whitford, H. W. 1994. **Isolation of Mycoplasmas from Clinical Specimens.** Mycoplasmosis in animals: Laboratory diagnosis. Edit. H. W. Whitford, R. F. Rosenbush y L. H. Lauerman. Micoplasmosis Committee of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians. Iowa State University Press: 12-14.

Yoder, H. W. Jr. 1990. Avian Mycoplasmas. **Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology.** Edit. Carter, G. R and J. Cole. 5<sup>th</sup> edition. Academic Press Inc: 333-341.

Zain, Z. M.; J. M. Bradbury. 1995. **The influence of type of swab and laboratory method on the recovery of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in broth medium.** Avian Pathol. 24:707-716.



## Anexos

### Anexo I: Metodología para la elaboración de medio de cultivo líquido de Frey 2X.

Nota: Para cada litro de medio a elaborar se requiere de:

Ingredientes	Cantidad
Agua desionizada	880 mL
Caldo base para micoplasma	22.5 g
Dextrosa	3 g
Cisteína, HCL	0.2 g
NAD	0.2 g
Extracto fresco de levadura	35 mL
Acetato de talio al 10 %	20 mL
* Suero porcino	120 mL
Penicilina	2 Millones de Unidades Internacionales (UI)
Rojo fenol al 1 %	2.5 ml

1. Se mezclan todos los ingredientes en un matraz mediante agitación constante hasta lograr una completa homogenización.
2. Se ajusta el pH a 7.8 con una solución de Hidróxido de Sodio (NaOH).
3. Se esteriliza mediante filtración (0.22 micras) bajo campana de flujo laminar.
4. Finalmente se deposita en tubos de ensaye estériles, se recomienda colocar 5 ml en cada tubo.
5. Realizar la prueba de esterilidad y la promoción de crecimiento para determinar la funcionalidad del medio.
6. El medio se almacena en la oscuridad entre 4 y 8 °C, y es usado en un plazo máximo de 3 meses a partir de la fecha de elaboración. Cuando el medio de cultivo se almacena a menos 70 °C, éste puede mantenerse indefinidamente.

\* Se requiere que el suero porcino se inactive a 50 °C durante 30 minutos

Kleven, 2000.

## Anexo II. Metodología para la elaboración de medio de cultivo sólido de Frey.

Para cada litro de medio a elaborar se requiere de:

Ingredientes	Cantidad
<b>Parte A</b>	
Agua desionizada	880 mL
Caldo base para micoplasma	22.5 g
Dextrosa	3 g
Acetato de talio al 10 %	20 mL
Extracto fresco de levadura	35 mL
Agar noble	10 g
<b>Parte B</b>	
Cisteína, HCL	0.2 g
NAD	0.2 g
* Suero porcino	120 mL
Penicilina	2 Millones de Unidades Internacionales (UI)
Rojo fenol al 1 %	25 ml

### Parte A

1. Se mezclan todos los ingredientes en un matraz mediante agitación constante hasta lograr una completa homogenización.
2. Se ajusta el pH a 7.8 con una solución de Hidróxido de Sodio (NaOH).
3. Se esteriliza por medio de autoclave a 121 °C / 15 lb durante 15 minutos

### Parte B

4. Se mezclan todos los ingredientes en un matraz mediante agitación constante hasta lograr una completa homogenización.
5. Se ajusta el pH a 7.8 con una solución de Hidróxido de Sodio (NaOH).
6. Se esteriliza mediante filtración (0.22 micras) bajo campana de flujo laminar.
7. La parte A y B se ajustan a 50 °C en baño María.
8. Se mezclan de forma aséptica en campana de flujo laminar.
9. Se deposita 15 mL en cajas de Petri de 90 X 15 mm y se deja solidificar.
10. Realizar la prueba de esterilidad y la promoción de crecimiento para determinar la funcionalidad del medio.
11. El medio se almacena en la oscuridad entre 4 y 8 °C, y es usado en un plazo máximo de 3 meses a partir de la fecha de elaboración. Se recomienda empaquetar en bolsas de plástico para evitar la deshidratación del medio.

\* Se requiere que el suero porcino se inactive a 50 °C durante 30 minutos.

Kleven, 2000.

**Anexo III. Tabla de resultados de aislamientos de *Mycoplasma spp* obtenidos de acuerdo al tiempo de incubación de cultivos primarios**

No de Muestra	Siembra 1er Tiempo (Día 0)	Siembra 2o Tiempo (Día 5)	Siembra 3er Tiempo (Día 10)	Siembra 4o Tiempo (Día 15)
5	4			
33	5			
46		2		
78		4	2	
91		4	2	
93		4	2	
52		4	4	
3		4		
54		4		
62		4		
83		4		
96		4		
99		4		
24		6	2	
73		6	2	
9		6	4	
11		6	4	
28		6		
66		6		
31			2	
39			2	
42			2	
82			2	
58				11
53				15
64				17

Descripción de Tabla:

La 1ª columna representa la identificación asignada a las muestras.

Las columnas 2 a 5, representan el momento de siembra en medio sólido y muestra los días de incubación requeridos para presentar crecimiento bacteriano en placa con colonias características de *Mycoplasma spp*.

---

**Anexo IV. Fotografías.**

Colonias de *Mycoplasma* spp. 40 X.

