

62
2ej.
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**“AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE *Mycoplasma synoviae*
MEDIANTE LA PRUEBA DE INHIBICION DE CRECIMIENTO”**

P U B L I C A C I O N
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
MARIA ISABEL LAZARO TORRES

ASESORES: M. en C. TONATIUH CRUZ SANCHEZ
M. V. Z. GILBERTO OCHOA URIBE

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

258730



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR

DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

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

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

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de Publicación : " Aislamiento e Identificación de Mycoplasma synoviae mediante la Prueba de Inhibición de Crecimiento " .

que presenta la pasante: María Isabel Lizaro Torres
con número de cuenta: 8715131-2 para obtener el TITULO de:
Médica Veterinaria Zootecnista .

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

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

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 01 de Diciembre de 1997

PRESIDENTE	<u>M.V.Z. José Rojo López</u>
VOCAL	<u>M.V.Z. Susana García Vazquez</u>
SECRETARIO	<u>M.C. Tonatzián Cruz Sánchez</u>
1er. SUPLENTE	<u>M.C. Alejandro Martínez Rodríguez</u>
2do. SUPLENTE	<u>M.V.Z. Raúl Radillo Rodríguez</u>

AGRADECIMIENTOS :

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Por abrirme sus puertas y así ampliar mi visión y espacios.

A LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Donde a lo largo de mi formación dentro de la Medicina Veterinaria pude canalizar muchas inquietudes y conocer a gente muy especial.

A MIS PADRES Y HERMANOS

Por formar una familia llena de hermosos matices.

Por enseñarme el valor de una vida digna y libre.

Por todo su apoyo y sacrificios.

MIL GRACIAS

A LA ARQ. ARACELI LÓPEZ HDEZ.

Por ser un gran ser humano y brindarme su amistad através de tanto tiempo

MIL GRACIAS

AL M.V.Z. GUSTAVO GUTIÉRREZ A.

Con gran admiración y respeto por su fortaleza y tenacidad ante la vida.

Por compartir conmigo algo muy especial.

MIL GRACIAS

A LA M.V.Z. CLAUDIA GONZÁLEZ P.

El trabajo tenaz, la paciencia, el consejo y compañía, así como el apoyo incondicional de su amistad y sobre todo durante la elaboración de este trabajo, son para mí de enorme valor.

MIL GRACIAS

A MIS AMIGOS

ELENA GARCÍA , ISABEL PADILLA, RAFAEL GONZÁLEZ

Por compartir sus experiencias y alegrías.

MIL GRACIAS

AL M.V.Z. DAVID TRUJILLO C.

Que amable y desinteresadamente nos brindo ayuda en el procesamiento de imagenes.

MIL GRACIAS

A LOS MÉDICOS VETERINARIOS

LUZ MARÍA ORTEGA,ADRIANA GARULO,GILBERTO OCHOA Y M.ANGEL C.

Al brindarme su apoyo y consejo durante la elaboración de este trabajo.

TONATIUH CRUZ, ARIEL ORTÍZ

Por su guía y apoyo durante la realización y presentación de este trabajo. así como todo el conocimiento adquirido mediante su enseñanza.

MIL GRACIAS

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO L 513. DE MICROBIOLOGÍA DE LA SECC. DE CIENCIAS DE LA SALUD ANIMAL. INTEGRADO A LA CÁTEDRA DE PRODUCCIÓN DE ANTÍGENOS Y ANTISUEROS PARA USO DIAGNÓSTICO. PUBLICADO DENTRO DEL XV CONGRESO LATINOAMERICANO DE AVICULTURA REALIZADO EN CANCÚN ,QUINTANA ROO, MÉXICO. ACEPTADO COMO OPCIÓN PARA TITULACIÓN.

RESUMEN

Con el objetivo de desarrollar la prueba de Inhibición de Crecimiento, se produjo suero hiperinmune específico para *Mycoplasma synoviae* en dos conejos Nueva Zelanda, inoculando 2 ml. vía subcutánea de una mezcla de *Mycoplasma synoviae* cepa WVU 1853 (ATCC) con adyuvante completo de Freund (1: 1) en los días 15,22,36 y 43 , el día 50 se sacrificaron los conejos para obtener el suero hiperinmune., a la titulación del suero se obtuvo un valor de 1:640.

Se obtuvieron 30 muestras de suero y extremidades de pollo de engorda con signos clínicos sugestivos de Sinovitis Infecciosa. A cada muestra de suero se le realizó la prueba de Aglutinación en Placa, empleando el antígeno de *Mycoplasma synoviae* cepa WVU 1853 (lab. Intervet), encontrándose 22 muestras positivas.

En las extremidades se puncionaron las articulaciones para obtener líquido sinovial y cultivarlo en medio de Frey a 37°C durante 7 días, posteriormente se sembraron en agar en condiciones de microaerofilia , considerándose positivos cultivos con crecimiento de colonias con forma de "huevo estrellado". Estas colonias se recuperaron para obtener cultivos puros, en estos se realizó la prueba de Inhibición de Crecimiento utilizando el suero hiperinmune producido. Se identificaron 9 muestras como *Mycoplasma synoviae*.

Como control se emplearon las cepas de referencia de *Mycoplasma synoviae* cepa WVU 1853 (ATCC) y cepa de *Mycoplasma gallisepticum* A5969 (Atlanta).

La prueba de Inhibición de Crecimiento es una herramienta útil de diagnóstico para la identificación de *Mycoplasma synoviae*. En México es necesario su instrumentación, así como la producción de antisueros específicos para la elaboración de otras pruebas diagnósticas.

INTRODUCCION

La infección por micoplasmas es un problema que afecta a la industria avícola desde hace décadas en todo el mundo. En México, sigue siendo un problema muy importante en productoras de huevo comercial, pollo de engorda, aún en progenitoras y reproductoras. (8). La infección es ocasionada por *Mycoplasma synoviae* y *Mycoplasma gallisepticum* .

Mycoplasma synoviae pertenece a la clase *Mollicutes*, orden *Mycoplasmatales*, familia *Mycoplasmataceae*, son considerados los procariotes más pequeños de vida libre tienen un tamaño de 0.2 a 0.5 micras, carecen de pared celular, por tanto son pleomórficos y muy sensibles al medio ambiente, se reproducen por fisión binaria y pueden observarse con tinciones de Giemsa y Romanowsky. Se transmite por vía venerea, aerosoles y muy importante su transmisión a través del huevo (5,6,11).

Mycoplasma synoviae es un importante patógeno de pollos de engorda asociado a Sinovitis Infecciosa aguda o crónica, produce sinovitis exudativa, tendosinovitis o bursitis. (1,5,7).

Sin embargo, la infección por *Mycoplasma synoviae* ha tomado mayor importancia porque se le asocia también a la producción de inflamación de sacos aéreos y problemas respiratorios.(7,12,13).

Los signos clínicos y lesiones son inespecíficas pudiéndose confundir con otras enfermedades, como Artritis viral, infecciones por *Corynebacterium spp*, *Salmonella spp*, *Pasteurella spp*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp*, y *Mycoplasma gallisepticum*, por lo cual adquiere enorme valor el aislamiento e identificación del agente así como el diagnóstico serológico . (1,4,7,).

Para realizar el aislamiento e identificación de *Mycoplasma synoviae* se toman muestras con material estéril de tráquea, sacos aéreos o articulaciones afectadas, se siembran en medio

líquido de Frey y después a medio sólido en ambiente microaerofílico a 37 ° C. Se observará en el agar colonias características de huevo estrellado de aproximadamente de 0.1 a 0.6 mm. de diámetro . Estas colonias se identifican por medio de pruebas como Inmunofluorescencia e Inhibición de Crecimiento. (1,8,13,14) .

En México la erradicación se ha basado solamente en pruebas serológicas como Aglutinación en Placa e Inhibición de la Hemoaglutinación. (3,7).

No se realiza en forma común el aislamiento y por tanto tampoco se desarrollan pruebas de diagnóstico específicas como: Inhibición de Crecimiento, Inmunofluorescencia, Inmunoperoxidasa, ELISA, etc. La importación de antisueños y reactivos es una limitante importante , así como la falta de instrumentación de métodos de aislamiento .

Es por esto que, el objetivo del presente trabajo es desarrollar la prueba de Inhibición de Crecimiento con un antisuero producido en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán para la identificación de *Mycoplasma synoviae* a partir de cepas de micoplasmas aisladas de pollos de engorda con lesiones sugestivas de Sinovitis Infecciosa.

MATERIAL Y METODOS

Obtención de muestras: Se obtuvieron muestras de 30 pollos que presentaron lesiones en extremidades sugestivas de Sinovitis Infecciosa. provenientes de diferentes granjas del Estado de México, en las cuales no se realiza monitoreo serológico ni vacunación contra micoplasmas. Los pollos se sacrificaron obteniéndose sangre de cada uno, recolectándose en envases de vidrio limpios para posteriormente separar el suero mediante centrifugación y conservandolo a -20°C . También se tomaron como muestras las extremidades de los pollos, las cuales se colocaron e identificaron de manera individual en bolsas de plástico y congeladas a -20°C . hasta su uso.

Prueba de Aglutinación en Placa: En esta prueba se utilizan las muestras de sueros de cada ave, se colocó una gota de suero y una gota de Antígeno de *Mycoplasma synoviae* cepa WVU 1853 (Lab. Intervet), en una placa de vidrio se mezcla y espera 2 min. para tener resultados, una reacción positiva se caracteriza por la aparición de grumos .

Obtención de suero Hiperinmune: Se inocularon dos conejos Nueva Zelanda de 2 Kg. de peso con una mezcla de *Mycoplasma synoviae* cepa WVU 1853 (ATCC) y adyuvante completo de Freund (1: 1), por vía subcutánea con 2 ml. cada uno, bajo el siguiente calendario: Día 0 se sangraron los conejos para obtener suero y realizar la prueba de Aglutinación en Placa con antígeno de *Mycoplasma synoviae* (lab. Intervet), para detectar la presencia de anticuerpos aglutinantes que puedan falsear la valoración del título alcanzado durante el calendario de inoculación . Después de esto se inoculó a los conejos.

Aislamiento e identificación. Para el aislamiento e identificación se usó el medio de cultivo de Frey (Kleven, 1983), tanto medio líquido como en agar .

El medio líquido de Frey fué distribuido en tubos estériles con tapón de baquelita conteniendo 3 ml cada tubo. El medio de agar fué colocado en cajas de petri estériles de 30 ml.

Para el aislamiento se puncionaron las articulaciones de las 30 extremidades de pollo con jeringas estériles que contenían 0.5 ml de medio de Frey líquido, se realizó un lavado articular y se obtuvo líquido sinovial de cada muestra, este se colocó en 30 tubos con medio de Frey respectivamente. De cada tubo se realizaron diluciones logarítmicas hasta 10^5 . Se incubaron a $37^{\circ}C$ durante 7 días hasta observar la aparición de turbidez y pequeños grumos.

Estos cultivos se sembraron en cajas de petri con medio de Frey sólido, incubandose en ambiente de microaerofilia en jarra de velobiosis a $37^{\circ}C$ durante 7 a 10 días. (1,6,7).

Se observaron los cultivos con microscópio estereoscópico, buscando colonias clásicas de "huevo estrellado". **FIG. 1** Las colonias encontradas se sembraron en medio líquido de Frey, colocando un bloque de agar donde se observaron colonias., todo el material utilizado en el proceso fué estéril. (3,9,13).

Se incubaron estos tubos bajo las mismas constantes durante 3 días. Los cultivos se sembraron nuevamente en medio líquido de Frey durante 3 días a $37^{\circ}C$. Estos últimos se consideraron cultivos puros.

Prueba de Inhibición de Crecimiento. Se utilizó el suero hiperimmune con mayor título y las colonias puras. Se emplearon discos de papel filtro Watmann del No. 1, se impregnaron con el suero hiperimmune y se colocaron sobre la superficie del agar previamente sembrado, se incubaron a $37^{\circ}C$ durante 7 días y se observaron al microscópio estereoscópico.

Se consideró como positivo un halo de inhibición de crecimiento alrededor del disco no menor

a 5 mm. (14, 15). **FIG. 2.**

Como control positivo se empleó la cepa de referencia de *Mycoplasma synoviae* WVU 1853 (ATCC) y como control negativo la cepa de *Mycoplasma gallisepticum* A5969 (Atlanta). Se utilizaron los mismos criterios de observación.

Todos los cultivos se trabajaron por duplicado.

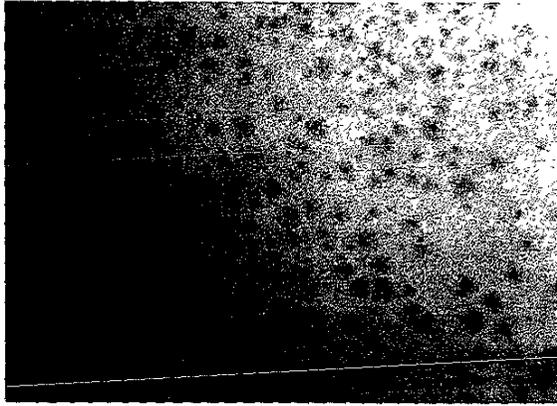


Fig. No. 1 Crecimiento de colonias de *Mycoplasma synoviae* aisladas de muestras de campo.

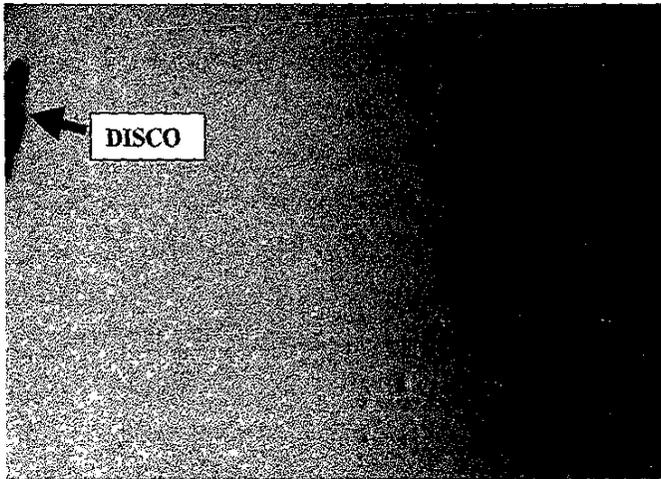


Fig. No. 2 Inhibición de crecimiento en cepa de referencia WVU 1853 (A.T.C.C.), de *Mycoplasma synoviae* en el extremo superior izquierdo se encuentra el disco impregnado con el suero hiperinmune producido. La zona amarilla corresponde a la inhibición de crecimiento.

RESULTADOS.

RESULTADOS OBTENIDOS EN EL TOTAL DE MUESTRAS						
Total de muestras	Prueba de Aglutinación		Aislamiento		Pba. de Inhibición de crecimiento a <i>Mycoplasma synoviae</i>	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
30	22	8	23	7	9	14
%	73%	26.6%	76.6%	23.4%	39.1 %	60.8%

Cuadro No. 1

En el cuadro No. 1 se registran el total de muestras, lograndose el aislamiento en un buen porcentaje. así mismo se observa que en 9 de los cultivos se detecta inhibición de crecimiento con el suero hiperinmune específico producido contra *Mycoplasma synoviae*.

Los cultivos con pobre crecimiento, se evaluaron hasta 15 días de incubación, a la observación el crecimiento alrededor del disco no se apegó a los parámetros que se establecieron, por lo tanto se reportaron como negativos a la prueba de Inhibición de Crecimiento.

Los cultivos que se utilizaron como control positivo y negativo, cubrieron los parámetros. Se encontró que la cepa de referencia de *Mycoplasma synoviae* creció de manera homogénea con colonias más pequeñas hacia el disco hasta la ausencia de ellas alrededor de este.

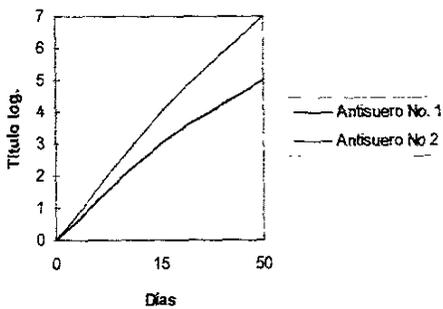
Con la cepa de referencia de *Mycoplasma gallisepticum*, se observó crecimiento uniforme con las colonias más pequeñas hacia el disco. pero no se encontró inhibición de crecimiento.

De los dos sueros hiperinmunes producidos, sólo uno alcanzó el título de 1: 640, que es el valor mínimo aceptado (Frey et. al. 1972). Este suero se utilizó para la prueba de Inhibición de Crecimiento. En la gráfica No. 1 se presenta como antisuero No. 2.

El título alcanzado de los sueros hiperinmunes producidos se convirtió en título logarítmico y se obtuvo una curva del título alcanzado durante los días de inoculación. Como se presenta a continuación:

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

Curva de titulación de antisueros



GRAFICA NO. 1

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

La Prueba de Aglutinación en Placa se utiliza como apoyo en el diagnóstico de micoplasmas por ser una prueba altamente sensible, aunque hay factores relacionados con el suero y la preparación del antígeno, así como la aplicación de vacunas emulsionadas que nos dan reacciones falsas positivas. Los resultados negativos se deben a la ausencia de anticuerpos específicos contra el micoplasma o por una baja concentración de estos no siendo evidente la reacción de aglutinación. (4,7,12).

El cultivo es la única forma de asegurar la presencia del micoplasma ya que los resultados serológicos pueden ser confusos por los motivos ya mencionados. (1,4,7, 12).

El aislamiento de micoplasmas considerados como puros se debieron mantener en congelación debido a la falta de material para su resiembra, este procedimiento influyó negativamente ya que se contaminaron cultivos perdiéndose cepas y al intentar de nuevo el aislamiento primario no se recuperaron todas las iniciales, con lo cual se redujo el número de cepas identificadas. Las cepas que no fueron inhibidas por el suero hiperinmune producido pueden ser otro tipo de micoplasmas. Se requiere de pruebas bioquímicas para su clasificación. (1,7,13,14).

No se estableció la sensibilidad y especificidad de la Prueba de Inhibición de Crecimiento debido a que no se realizaron Pruebas Bioquímicas u otras pruebas de identificación a los cultivos obtenidos y por tanto no tenemos un parámetro para establecer estos porcentajes.

Para la valoración de la Prueba de Inhibición de Crecimiento como método de identificación se utilizaron cepas de referencia, con las cuales se valoró el poder de inhibición del suero hiperinmune producido específico contra *Mycoplasma synoviae*.

Los resultados de esta prueba dependen de criterios de observación, obtención de crecimiento abundante y homogéneo del micoplasma y de la especificidad del suero hiperinmune. (9,10,13).

El suero hiperinmune producido no se comparó con sueros hiperinmunes de referencia ya que no existen en el país.

La titulación del suero hiperinmune producido se llevó a cabo mediante la prueba de microaglutinación debido a que en estudios realizados se considera una prueba de sensibilidad y especificidad aceptable comparada con las pruebas de Aglutinación en Placa, Aglutinación en Tubo e Inhibición de la Hemoaglutinación . (Ortiz y Yamamoto, 1974). (Lin y Kleven).

Aunque el aislamiento de micoplasmas es arduo y tardado se lograron buenos resultados al poder observar su crecimiento en la mayoría de los cultivos en medio de Frey. Este medio fue enriquecido utilizando suero de equino y levadura estériles , siendo importante evitar la contaminación de estos elementos durante su conservación y aplicación al medio de cultivo.

El aislamiento primario de *Mycoplasma synoviae* es generalmente más fácil que su conservación.(7,12).

En México hay pocos trabajos sobre cultivo y procedimientos de identificación en micoplasmas, así como en producción de antisueros, conjugados y antígenos específicos que son indispensables para el desarrollo de pruebas diagnósticas. (3,8,12).

El conocimiento de la metodología y su aplicación nos sirvió para poder instrumentar estas técnicas y así poder avanzar a nuevas expectativas de diagnóstico como las pruebas de Inmunofluorescencia e Inmunoperoxidasa .

BIBLIOGRAFIA.

1. **Calnek, B. W., cole.** (1991). Diseases of poultry. Nine edition. Board for the American., Asociation of Avian Pathologist. Iowa State University Press. USA.pp. 197-223.
2. **Carter., cole.** (1990). Diagnostic procedures in Veterinary Bacteriology and Micology. Fifth adition Copyright by Academic Press. USA.pp.333-341.
3. **Etcharren, L.A., et al** (1992). Aislamiento de *Mycoplasma synoviae* y *Mycoplasma gallisepticum* de aves comerciales en México (identificación mediante inmunofluorescencia directa). III Jornada Médico Avícola, Dpto. de Producción Animal: Aves. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia . UNAM . México. pp 65-66
4. **Gordon, R.F.** (1980). Enfermedades de las aves. Editorial El Manual Moderno. México . pp. 44 - 47.
5. **Howard, W., cole.** (1994). Mycoplasmosis in animals. Laboratory diagnosis. First edition. Commite of the American Asociation of Veterinary Laboratory Diagnosis. Iowa State University Press. USA. pp.3-34.
6. **Kleven, S. H.** (1983). Laboratory Techniques for Avian Mycoplasmas. University of Georgia Departament of Avian Medicine. pp. 58-74.
7. **Márquez-López, S.** (1984). Aislamiento de micoplasmas a partir de sacos aereos de pollos de engorda con problemas respiratorios. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México.
8. **Ortiz, M.A.** (1992). Control de la micoplasmosis aviar . III Jornada Médico Avícola . Dpto. de Producción Animal: Aves. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México. pp 170-171.
9. **Ortiz, A., and Yamamoto R.** (1974). Departament of Epidemiology and Preventive Medicine. University of California. USA. p.p. 1-9.

10. **Quinn, P. J.**, et al. (1994). *Clinical Veterinary Microbiology*. First edition. Wolfe. London. p.p. 320-326.
11. **Randall, C. J.** (1989). *Enfermedades de las aves domésticas y de corral*. Editorial Interamericana Mc. Graw Hill. España. pp. 30-33.
12. **Rodríguez M. G.** (1989). Estudio exploratorio de aglutininas contra *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* en aves productoras de carne y huevo de diferentes zonas avícolas de la República Mexicana. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México.
13. **Ruiz, H. L.** , et al (1992). Inducción de lesiones en embrión de pollo por inoculación con *Mycoplasma synoviae*. III Jornada Médico Avícola. Dpto. de Producción Animal : Aves. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México. pp. 213-214.
14. **Tully, J. G and Whitcomb, R.F.** (1979). *Human and Animal Mycoplasmas*. Vol. II Academia Press London. London. pp. 8-42.
15. **Williams, E. J.**, et al. (1980). *Isolation and Identification of Avian Pathogens*. American Association of Avian Pathologists. University of Texas USA. pp.136-139.