



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**Detección de *Mycoplasma gallisepticum* en aves de combate residentes del
Valle de México por aglutinación en placa y reacción en cadena de la
polimerasa.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

ARTURO MONTES DE OCA MORALES

ASESOR

MVZ MC FÉLIX D. SÁNCHEZ GODOY

MVZ DR. NÉSTOR LEDESMA MARTÍNEZ



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.

Dedicatoria

**A mi mamá Margarita Morales y a mi papá Arturo Montes de Oca, a quienes
admiro, de quienes me siento totalmente orgulloso y los amo.**

Agradecimientos

Al doctor Félix D. Sánchez Godoy quien gracias a su apoyo, paciencia, motivación dedicación y consejos. Logre concluir este ciclo.

Al Doctor Néstor Ledesma Martínez por el apoyo brindado para la realización de esta tesis.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, así como a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y un muy especial agradecimiento al Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves por ser parte de ellos

A la Federación Mexicana de criadores de gallos de pelea por su apoyo a la investigación, así como al MVZ Agustín Peña por compartir un poco de sus conocimientos en aves de combate

A los criadores de aves de combate que compartieron sus experiencias y me permitieron ingresar a sus galleras

A Itzel Bautista y Anahí Ubiarco por compartir sus conocimientos y acompañarme durante este periodo.

Así como a mis amigos que me me han acompañado durante un largo tiempo

CONTENIDO

	Página
Lista de abreviaturas	1
Lista de figuras	2
Lista de tablas	3
Resumen	4
Introducción	5
Justificación	10
Objetivos generales	11
Objetivos específicos	11
Hipótesis	11
Material y métodos	11
Resultados	15
Discusión	16
Conclusión	19
Referencias	20
Figuras y tablas	24

Lista de abreviaturas

Mg *Mycoplasma gallisepticum*

AP **Aglutinación en placa**

IH **Inhibición de la hemoaglutinación**

ELISA **Enzyme linked immunosorbent assay**

Lista de figuras

		Página
Figura 1	Prueba de aglutinación en placa.	24
Figura 2	Distribución geográfica de las galleras.	25
Figura 3	Número de muestras por estado.	26
Figura 4	Sero-prevalencia de anticuerpos anti- <i>M.gallisepticum</i> por prueba de aglutinación en placa en aves de combate	26
Figura 5	Sero-positivos anti- <i>M.gallisepticum</i> por prueba de aglutinación en placa en aves de combate por estado.	27
Figura 6	Sero-prevalencia a anticuerpos anti- <i>M.gallisepticum</i> por prueba de aglutinación en placa en aves de combate por estado.	28
Figura 7	Porcentaje de galleras positivas por aglutinación en placa.	29
Figura 8	Porcentaje de gallos positivos por PCR para la detección de <i>M. gallisepticum</i> en muestras de tráquea.	29
Figura 9	Detección de <i>M.gallisepticum</i> en muestras de tráquea.	30
Figura 10	Porcentaje de gallos positivos por aglutinación en placa y PCR.	31
Figura 11	Límite de detección de la PCR punto final	32

Lista de tablas

		Página
Tabla 1	Número de muestras por galleria en cada estado y número de casos positivos a prueba de aglutinación en placa y PCR.	33
Tabla 2	Interpretación de los valores del coeficiente de correlación según el rango de valores.	35

Resumen

Arturo Montes de Oca Morales: Detección de *Mycoplasma gallisepticum* en aves de combate residentes del Valle de México por aglutinación en placa y reacción en cadena de la polimerasa. Asesorado por MVZ MC Félix D. Sánchez Godoy, MVZ Dr. Néstor Ledesma Martínez.

En el presente estudio se evaluó la detección de *Mycoplasma gallisepticum* en aves de combate de 21 galleras distribuidas en el Valle de México por medio de aglutinación en placa y reacción en cadena de la polimerasa, se recolectaron 120 muestras de suero y secreciones traqueales, el 43.33% (52 muestras) fueron del Distrito Federal, 40.33% (49 muestras) del Estado de México y el 15.83% (19 muestras) de Morelos. El 57% de las galleras presentaron al menos un ave positiva por aglutinación en placa y del total de los sueros, el 20% (24 muestras) fueron positivos a la presencia de anticuerpos anti-*M.gallisepticum*. Por medio de la reacción en cadena de la polimerasa se detectó DNA de *M. gallisepticum* en el 7.5% (9 muestras) y en solo 4 muestras (3%) se detectó positividad para ambas pruebas. La sero-prevalencia observada es inferior con lo descrito en la literatura; sin embargo, se considera importante ya que este estudio fue realizado en aves clínicamente sanas que pueden transmitir de manera vertical al microorganismo y perpetuar la presencia del agente infeccioso en las galleras.

1. Introducción.

Una rama de la avicultura deportiva es la crianza de aves de combate. Esta especie es importante en México debido al impacto económico, social y sanitario, independientemente de su tan controversial fin.

En México se incuban de manera natural o artificial alrededor de 95 millones de huevos, de los cuales eclosiona el 60%, es decir 57 millones pollos de los cuales se estima que el 50% son hembras y el 50% son machos, de los 28.5 millones de machos nacidos, no todos llegan a una etapa adulta, con una mortalidad aproximada del 30%, se estima que sólo llegan a la edad adulta 19.95 millones de aves de combate (Guerrero, 2014).

Esta actividad causa un impacto económico y social que repercute directamente en los criadores de aves de combate, promotoras de eventos, palenques, artesanos, industrias afines a la actividad gallística y venta de artículos (Guerrero, 2014).

Se estima que en el Estado de México existe una derrama económica anual de más de \$ 3,700 millones de pesos, los cuales se desglosan principalmente en la crianza, palenques y casteos (Gonzalez, 2014).

Así mismo, se estima que al menos en los palenques se generan aproximadamente 90,125 empleos anualmente, con una derrama económica aproximada de \$21,375,500.00 pesos y al menos 225,000 empleos directos por parte de las galleras, en la preparación de los gallos por 40 días, lo que causa una derrama económica anual de \$ 1,800 millones de pesos (Gonzales, 2014).

Las enfermedades en las aves de combate son generalmente multifactoriales, dependen de la edad, sexo, condición física, estado nutricional, inmunidad deficiente contra la enfermedad de Marek (EM), Bronquitis infecciosa (BI), Laringotraqueítis infecciosa (LTI) e Infección de la Bolsa de Fabricio (IBF) y agentes bacterianos como *Salmonella* sp y *Mycoplasma* sp. Así mismo, existen otros factores predisponentes como la mala ventilación, exposición a otras poblaciones,

crianza multi-edad, la presentación de estos factores propicia la transmisión o el desarrollo de una enfermedad (Casaubon, 2014)

Uno de los principales problemas que se presentan en las aves de combate son los trastornos respiratorios, que pueden tener un origen viral (Newcastle e influenza) o bacteriano (*Mycoplasma gallisepticum*), con la complicación de agentes bacterianos secundarios como *Escherichia coli*. La interacción de estos tres agentes (virales, bacterianos y complicantes), causan la enfermedad respiratoria crónica complicada en aves domésticas, se considera que *M. gallisepticum* es el principal factor determinante (Casaubon, 2014).

1.1 Agente etiológico.

Los micoplasmas pertenecen a la clase Mollicutes, orden Mycoplasmatales, de la familia Mycoplasmataceae (Noel *et al.*, 1984), son los procariontes más pequeños autorreplicables, se han encontrado más de 120 especies (Venosa, 2011), el ADN contiene entre 23 a 40% de Guanina-Citocina, el tamaño del genoma es de 600-1350 pb, requiere colesterol para su crecimiento y su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C. Carecen de pared celular ya que son incapaces de sintetizar peptidoglucano, y son resistentes a los antibióticos que interfieren con la síntesis de la pared celular, las colonias en cultivo puro son semejantes a un “huevo estrellado”. Están delimitadas por una membrana plasmática, microscópicamente tienen forma esférica cocoide a filamentosa. Debido a que causa enfermedad, ya sea como agente patógeno primario, o bien asociado a otros microorganismos, *Mycoplasma gallisepticum* adquiere importancia diagnóstica en las aves de combate (Ley, 2008).

1.2 Especies susceptibles.

La infección de *Mycoplasma gallisepticum* se presenta de manera natural en pollos y pavos. No obstante, también se puede aislar de infecciones naturales en faisanes, perdiz, pavorreal y codorniz. Se ha informado que ocasiona conjuntivitis en pinzones mexicanos (*Carpodacus mexicanus*), jilgueros amarillos (*Carduelis tristis*) y otros passeriformes (Gharaibeh *et al.*, 2011).

1.3 Signos clínicos.

El desarrollo del cuadro clínico varía desde asintomático hasta grave y depende de la presencia de otros agentes patógenos o factores estresantes. Las infecciones más graves se observan cuando las aves se infectan simultáneamente con el virus de la enfermedad de Newcastle o Bronquitis infecciosa, *Escherichia coli* u otros agentes patógenos. Las aves afectadas generalmente desarrollan signos clínicos respiratorios que pueden incluir estertores, estornudos, secreción nasal y disnea. Las infecciones por *Mycoplasma gallisepticum* no complicadas, con frecuencia no causan signos clínicos ni mortalidad. Las parvadas infectadas por *Mycoplasma gallisepticum* presentan retraso en el crecimiento, mal índice de conversión alimenticia, baja producción de huevo, disminución en la fertilidad e incubabilidad, así como el nacimiento de pollitos débiles infectados de manera vertical. Los signos de la micoplasmosis aviar se desarrollan lentamente y el curso de la enfermedad es crónico; sin embargo, algunas veces puede producir una enfermedad respiratoria aguda en las aves jóvenes. En pollos de engorda, casi todos los brotes se presentan entre la semana 4 y 8 de edad, los signos, por lo general, son más marcados que los observados en parvadas de aves adultas (Asgharzade *et al.*, 2013).

1.4 Lesiones.

En casos no complicados las lesiones generalmente incluyen inflamación serosa a catarral de los senos infraorbitarios (sinusitis), tráquea (traqueítis) y de los sacos aéreos (aerosaculitis). Con infecciones simultáneas (enfermedad respiratoria crónica complicada) por virus respiratorios y enterobacterias (*E.coli*) se puede observar aerosaculitis, neumonía, pericarditis y hepatitis fibrinopurulenta a caseosa. También se puede observar artritis y salpingitis (Leigh *et al.*, 2012).

1.5 Transmisión.

La transmisión es horizontal y vertical. La transmisión horizontal es por contacto directo entre aves enfermas y sanas, ya que la bacteria se elimina a través de secreciones respiratorias y por heces (Much *et al.*, 2002). La transmisión indirecta es por contacto de las aves sanas con equipo e instalaciones contaminadas con el

agente infeccioso, se ha demostrado que *M. gallisepticum* puede sobrevivir hasta por 4 días en el medio ambiente (Christensen *et al.*, 1994). La transmisión vertical es a través del huevo, la cual es muy eficiente y garantiza la presencia de la enfermedad en el campo. Las aves infectadas son portadoras de *M. gallisepticum* durante toda la vida y pueden no presentar signos hasta que sufren estrés o interactúan con otros agentes infecciosos como virus o bacterias (Liu *et al.*, 2013).

1.6 Importancia.

La micoplasmosis por *M. gallisepticum* tiene una distribución mundial y es una de las enfermedades de más importancia en las aves comerciales debido a las grandes pérdidas económicas, pero se desconoce el impacto en los gallos de pelea. Las aves infectadas presentan retraso en el crecimiento, pérdida de peso, mayor susceptibilidad a agentes infecciosos virales y bacterianos, reacciones post vacunales severas, baja en la producción de huevo, en las reproductoras disminuye la fertilidad e incrementa la mortalidad embrionaria y el nacimiento de pollitos pequeños y débiles. Así mismo, se sabe de la capacidad de *M. gallisepticum* para crear un efecto sinérgico junto con los virus respiratorios (Enfermedad de Newcastle y Bronquitis infecciosa) y *E. coli*, ocasionando una infección respiratoria grave con elevada morbilidad y mortalidad. Se ha documentado que la infección en gallinas de postura puede ocasionar un descenso de hasta el 40% de la producción de huevo. En Estados Unidos se estima que las pérdidas económicas asociadas a MG son de aproximadamente \$118,000,000 de dólares anuales (Sasipreeyajan *et al.*, 1987).

1.7 Morbilidad y mortalidad.

Los casos clínicos suelen ocurrir durante el invierno, y los factores estresantes tales como las infecciones virales, la vacuna de virus activo o el hacinamiento pueden desencadenar la enfermedad en las parvadas infectadas. En aquellas que no se presentan complicaciones, el índice de morbilidad es alto (90% al 100%) y el de mortalidad es bajo (10%); sin embargo, si ocurren brotes graves en donde las aves se infectan simultáneamente con virus o con bacterias, los índices de mortalidad se pueden elevar hasta el 30% (Jordan y Patison, 2008).

1.8 Distribución.

M. gallisepticum se puede encontrar en todo el mundo. En los Estados Unidos este organismo ha sido erradicado de la mayoría de las granjas comerciales de pollos y pavos, pero aún está presente en otras actividades avícolas. En Latinoamérica, el medio Oriente y África se observa una seroprevalencia del 30 al 40% (The Center for Food Security y Public Health, 2007).

1.9 Métodos de diagnóstico.

Las pruebas de diagnóstico para la micoplasmosis las podemos dividir en dos, indirectas y directas. Las pruebas indirectas se basan en la detección de anticuerpos contra *Mycoplasma* en el suero, este diagnóstico es particularmente útil sobre todo para hacer un diagnóstico de parvada. Los ensayos que se utilizan con frecuencia son la prueba de aglutinación en placa, ELISA y la inhibición de la hemoaglutinación (Kleven *et al.*, 2008).

1.9.1 Aglutinación en placa.

La prueba de aglutinación en placa es la más sencilla, económica, rápida y, por lo tanto, es la prueba de elección cuando se trata de determinar si hay exposición de la parvada a *Mycoplasma*, debido a su bajo costo pueden analizarse en un gran número de sueros. La prueba AP es altamente eficiente en la detección de anticuerpos IgM (Tristram *et al.*, 2001)

1.9.2 Inhibición de la hemoaglutinación.

La prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IH) permite detectar y cuantificar anticuerpos en concentraciones muy bajas (1µg/ml). Esta técnica está basada en la capacidad de los anticuerpos para inhibir la aglutinación de los eritrocitos por parte del antígeno. Es utilizada comúnmente para confirmar casos positivos por aglutinación en placa y ELISA (Snell y Cullen, 1977).

1.9.3 ELISA.

La técnica ELISA fue desarrollada para incrementar la eficiencia en la detección de aves infectadas con *Mycoplasma gallisepticum* al mejorar la especificidad y sensibilidad con respecto a la aglutinación en placa y la IH. (Nascimento *et al.*, 2005)

Los signos clínicos, lesiones y los resultados positivos por pruebas serológicas deben confirmarse por pruebas de diagnóstico directas.

1.9.4 Aislamiento bacteriológico.

El aislamiento y la identificación del microorganismo se consideran la prueba de oro para confirmar el diagnóstico en aves seropositivas. Para lo cual se envían muestras de la coana palatina, orofaringe, esófago, tráquea y cloaca y se siembran en medios especializados como Frey, suplementado con suero e inhibidores de crecimiento, para evitar la contaminación bacteriana. La principal desventaja de este método es que el crecimiento de la bacteria es lento y puede haber falsos negativos (Ley, 2008).

1.9.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La PCR se ha convertido en una valiosa herramienta para ayudar en el diagnóstico de *Mycoplasma gallisepticum*, la principal ventaja de la PCR son la rapidez, sensibilidad y especificidad en la detección del ADN de la bacteria a partir de muestras de secreciones tomadas con hisopos y de otros órganos, en comparación con las técnicas de aislamiento, que toman mucho más tiempo (Salisch *et al.*, 1999)

2. Justificación.

La infección con *Mycoplasma gallisepticum* es considerada como la primera causa de enfermedades respiratorias crónicas en las aves domésticas, cuya importancia se ha documentado ampliamente en las aves comerciales (pollo de engorda y gallina de postura); sin embargo, existen pocos estudios en aves de combate que determinen la incidencia de este microorganismo en las galleras.

3. Objetivo general.

Detectar aves de combate de galleras del centro del país, seropositivas e infectadas con *Mycoplasma gallisepticum* a través de aglutinación en placa y reacción en cadena de la polimerasa punto final.

3.1 Objetivos específicos.

1. Detectar aves de combate positivas a *Mycoplasma gallisepticum*, por medio de la prueba de aglutinación en placa.
2. Estandarizar la prueba de reacción en cadena de la polimerasa punto final para la detección de ADN de *Mycoplasma gallisepticum*.
3. Aplicar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa punto final para detectar ADN de *Mycoplasma gallisepticum* en secreciones traqueales de aves de combate.
4. Determinar el número de galleras seropositivas e infectadas con *Mycoplasma gallisepticum*.

4. Hipótesis

Se espera encontrar una seprevalencia por la prueba de aglutinación en placa y una infección a *Mycoplasma gallisepticum* por PCR punto final, en el 50% de las muestras examinadas de aves de combate residentes del valle de México.

5. Material y métodos.

El estudio se realizó en el laboratorio de diagnóstico e investigación en enfermedades de las aves del Departamento de Medicina y Zootecnia de aves de la FMVZ-UNAM.

5.1 Obtención de muestras.

Se recolectaron 120 muestras de sangre y de secreciones traqueales de aves de combate. Por razones prácticas, solo se tomaron muestras del 10% de la población total de cada gallera, en los meses de mayo a agosto de 2013. Todas las aves se encontraban clínicamente sanas.

Se obtuvieron 49 muestras (40.83%) de cuatro galleras del Estado de México, tomadas en los municipios de Lerma (n= 7) , Ocoyoacac (n= 7), el Oro (n= 10) y Toluca (n= 25); en el Distrito Federal se tomaron 52 muestras (43.33%), 9 galleras en Gustavo A. Madero (n= 31), 5 galleras en Milpa Alta (n= 12) , 1 en Tláhuac (n= 8) y 1 en Magdalena Contreras (n= 2); en el estado de Morelos se tomaron 19 muestras (15.83%) en una gallerá en el municipio de Jonacatepec (Figuras 1 y 2, Tabla 1).

5.2 Muestras sanguíneas.

Se obtuvieron 2 ml de sangre por punción de la vena radial, utilizando una aguja hipodérmica de 21G X 32 mm, la sangre se depositó en tubos de vidrio, sin anticoagulante, se inclinaron en ángulo de 45° y se dejaron a temperatura ambiente por 4 horas, posteriormente se recolectó el suero con una pipeta Pasteur y se depositó en tubos eppendorf de 1.7 ml, las muestras se conservaron en refrigeración (4-8°C) hasta su uso.

5.3 Muestras de tráquea.

Se tomaron muestras de la mucosa traqueal a través de la introducción de hisopos de algodón estériles por la laringe, se depositaron en tubos de vidrio estériles con 3 ml de PBS estéril y se congelaron a -20 °C hasta su uso.

5.4 Prueba de Aglutinación en Placa

La prueba de aglutinación en placa se llevó a cabo con el antígeno de *Mycoplasma gallisepticum* (AG-MG®, X-OVO LTD, UK), para lo cual se depositaron 25µl de suero sobre una placa de acrílico, posteriormente se mezcló con 25µl de antígeno mediante movimientos circulares suaves, se dejó incubar a temperatura ambiente por 2 minutos y se realizó la lectura (Figura 1).

5.5 Extracción de ADN

Las muestras de hisopo traqueal, se descongelaron y se agitaron por 2 minutos utilizando un vortex^a, se recolectó 1 ml de PBS que fue incubado a 95°C por 10

^a Daigger vortex genie 2

minutos en un termoblock^b y posteriormente fueron refrigerados a 4°C por 5 minutos. La vacuna FVAX-MG[®] (MSD Animal Health) utilizada como control positivo fue sometida al mismo procedimiento.

5.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa

Se utilizaron los iniciadores NAS-F sentido (5'-GGATCCCATCTCGACCACGAGAAAA-3') y NAS-R contra sentido (5'-CCTTCAATCAGTGAGTAACTGATGA-3'), que amplifican un fragmento de 760 pb, del gen que codifica para la síntesis de lipoproteínas (Nascimento *et al.*, 1990) (GenBank AF075588). Como control positivo se utilizó la vacuna de *Mycoplasma gallisepticum* FVAX-MG[®] y como control negativo agua destilada estéril. El volumen final ocupado para la reacción de PCR es de 20µl, el cual contiene 2µl de Buffer Taq (NH₄)₂SO₄(10X), 0.4µl de dNTP's (10mM), 0.5µl de Iniciador NAS-F(10µM), 0.5µl de Iniciadores NAS-R(10µM), 1µl de Tritón (2%), 1µl de BSA(3mg/ml), 2µl de MgCl₂ (25mM), 7.6µl de agua estéril, 0.5 de Taq polimerasa (5U/µl) y 5 µl de la extracción de DNA de las muestras. Para llevar a cabo la reacción se utilizó un termociclador,^c programado con un ciclo de desnaturalización inicial de 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 56 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos y un ciclo de extendido final de 72 °C por 10 minutos. Los productos del PCR fueron corridos a 100 Volts por 30 minutos mediante electroforesis horizontal en una gel de agarosa^d al 2%, en donde se colocó un marcador de peso molecular de 1 kb^e. Posteriormente fueron teñidos con bromuro de etidio, por 30 minutos y observados bajo luz ultravioleta^f.

5.7 Límite de detección de *M. gallisepticum* por PCR

El límite de detección de la técnica de PCR se evaluó mediante diluciones decuples seriadas de la vacuna de *M.gallisepticum* cepa F (FVAX-MG[®] MSD Animal Health), hasta la dilución 10⁻⁶, utilizada como control positivo, cuya concentración comercial es de 10⁶ UFC reconstituida en 30 ml de PBS estéril.

^b Labnet D11000

^cThermohybrid PCRExpress

^d Promega corporation 608-274-4330 Madison WI53711-5399 USA

^e Fermentas 789 Cromwell Park Giern Burnie MD21061 USA Catalogo #SM0313

^f UVP Modelo 20, Upland CD 91786 USA

5.8 Análisis de resultados

Para determinar la correlación existente entre ambas pruebas se realizó el análisis de correlación paramétrica de Pearson.

6. Resultados

De las 120 muestras, se obtuvieron 49 muestras (40.83%) de cuatro galleras del Estado de México, tomadas en los municipios de Lerma (n= 7) , Ocoyoacac (n= 7), el Oro (n= 10) y Toluca (n= 25); en el Distrito Federal se tomaron 52 muestras (43.33%), 9 galleras en Gustavo A. Madero (n= 31), 5 galleras en Milpa Alta (n= 12), 1 en Tláhuac (n= 8) y 1 en Magdalena Contreras (n= 2); en el estado de Morelos se tomaron 19 muestras (15.83%) en una gallerá en el municipio de Jonacatepec (Figuras 2 y 3, Tabla 1). Detectando anticuerpos anti-*M. gallisepticum* en el suero de 24 aves (20%) (Figura 4). Las aves positivas se encontraron en el Distrito Federal y el Estado de México. En el Estado de México se encontraron aves positivas en Ocoyoacac (6/7) y en el Oro (4/10) con una prevalencia del 20.40 %. En el Distrito Federal se encontraron 14 respuestas positivas en las delegaciones Gustavo A. Madero (7/31), Milpa alta (5/13) y Magdalena Contreras (2/2) con una prevalencia del 26.92% (Figura 5 y 6) y observando que de las 21 galleras estudiadas, se halló en al menos, en 12 de ellas (57.14%) una respuesta positiva por aglutinación en placa (Figura 7) y detectando por estado, el 50% (2/4) en el Estado de México y 62% (10/16) en el Distrito Federal.

Con respecto a la PCR, se logró detectar ADN de *M. gallisepticum* en 9 muestras (7.5%) de hisopos traqueales, que correspondieron a tres galleras del Estado de México, Ocoyoacac (5/7), el Oro (2/10), y Lerma (1/7). También la gallerá de Jonacatepec Morelos fue positiva (1/19) (Figuras 8 y 9).

Solo 4 de las aves (3.33%) resultaron positivas por ambas pruebas, las cuales corresponden a la gallerá de Ocoyoacac en el Estado de México (Figura 10).

En cuanto al límite de detección del PCR, se logro detectar ADN de la vacuna F de *Mycoplasma gallisepticum* en la dilución 10^{-5} equivalente a 10 UFC (Figura 11)

Se determinó el coeficiente de correlación entre la aglutinación en placa y la reacción en cadena de la polimerasa y fue del 0.174, lo que indica una correlación muy baja entre ambas pruebas (Tabla 2).

7. Discusión

En la población de aves de combate del grupo de estudio se observó positividad a anticuerpos anti-*Mycoplasma gallisepticum*, a través de la prueba de aglutinación en placa, del 20%. Esto difiere con otro estudio en México, realizado por García en el 2012, quien efectuó un estudio retrospectivo de las principales enfermedades en aves de combate remitidas al laboratorio de diagnóstico e investigación en enfermedades de las aves del Departamento de aves de la FMVZ-UNAM del 2000 al 2011, trabajó con 138 sueros y observó una seropositividad por aglutinación en placa del 68.1%. Esta diferencia se puede deber a que las muestras provenían de gallos de combate con un problema clínico detectado dentro de la gallera, a diferencia de este estudio en el que se trabajó con aves clínicamente sanas. Así mismo, muchas de las aves incluidas en el estudio de García presentaron infecciones por dos o más agentes infecciosos, ya que en el 23.89 % presentaron lesiones de enfermedad de Marek, y 10.2% de los caso tenían anticuerpos contra la Enfermedad de Newcastle, Bronquitis infecciosa e Influenza Aviar y en 39 casos donde fue posible aislar *E. coli* (53.84% de los casos). Todos estos microorganismos pueden ser agentes predisponentes o agravantes de la enfermedad respiratoria crónica complicada y pueden contribuir a una mayor detección serológica de *M. gallisepticum* (Wunderwald *et al.*,2002).

Talavera *et al.*, (2012) recolectó muestras de 323 aves de combate en el altiplano del Estado de México de una población total de 2846 que pertenecen a 29 galleras, durante los meses de diciembre de 2010 a mayo de 2011 y detectaron 79% de seroprevalencia a *M.gallisepticum*, mediante aglutinación en placa; sin embargo, no aporta datos sobre los criterios de inclusión de las aves muestreadas (clínicamente sanas o con problemas respiratorios), el estudio se realizó en época de invierno y esto favorece una mayor presentación de enfermedades de tipo respiratorio. No obstante, algunas de las muestras se tomaron en los mismos municipios, tales como Toluca y Ocoyoacac, en los que se observó una sero-prevalencia del 77% y del 94%. Lo cual también difiere de este estudio, en el que se observó una sero-

positividad del 7% y del 71.42% respectivamente, al igual que la prevalencia obtenida en el Estado de México del 20.14%.

Se observó que la sero-prevalencia entre el Estado de México (20.14%) y el Distrito Federal (26.92%) es similar, así mismo, se observó que el 62% de las galleras en el Distrito Federal y el 50% de las galleras muestreadas en el Estado de México fueron positivas a *M. gallisepticum*, por lo que se puede inferir el impacto de esta enfermedad en las aves de combate. Se ha demostrado que la transmisión horizontal por contacto directo puede detectarse al tercer día pos infección (Feberwee *et al.*, 2005) y la transmisión indirecta puede llevar a cabo por medio de equipo contaminado ya que *M. gallisepticum* puede permanecer viable hasta por cuatro días en el ambiente (Christensen *et al.*, 1994) y afectar al 100% de la población.

Ante estos datos podemos sugerir que la prevalencia a *M. gallisepticum*, varía de acuerdo con las regiones geográficas, época del año, nivel de bioseguridad, sistemas de crianza, presencia de enfermedades inmunodepresoras o respiratorias y grado de virulencia de la cepas de *M. gallisepticum*. (Wunderwald *et al.*, 2002, Xavier *et al.*, 2011). La sero-prevalencia a *M.gallisepticum* por aglutinación en placa debe ser confirmada por otras pruebas serológicas o de diagnóstico directo ya que se encuentra documentada reacciones falsas positivas en aves infectadas por *M. synoviae*. (Breeders *et al.*, 2011, Feberwee *et al.*, 2004),

Con respecto a los iniciadores utilizados para realizar la prueba de PCR en este estudio, Nascimento *et al.*, (1990) señaló que los iniciadores NAS-F y NAS-R pueden detectar diversas cepas de *M.gallisepticum* y que no hay reacciones cruzadas con al menos otras especies de micoplasmas incluyendo *M. synoviae*, *M. imitans*, y *M. meleagridis*. Así mismo, García *et al.*, (2005) demostró que la PCR con estos iniciadores tienen una buena correlación con el aislamiento del agente infeccioso.

El límite de detección de ADN de *M.gallisepticum* en este estudio no fue evaluado debido a que el método de extracción de ADN utilizado no incluye la purificación del

material genético de la vacuna, sin embargo se realizaron diluciones decuples seriadas de la vacuna F encontrando como límite de detección la dilución 10^{-5} equivalente a 10 UFC. En el estudio realizado por Fraga *et al.*, en el 2012 observó que el límite de detección de estos iniciadores utilizando como control positivo la vacuna TS-11 fue de 10^{-5} como ocurrió en este estudio.

En estudios experimentales se ha demostrado que la detección de *M. gallisepticum* en secreciones traqueales y de anticuerpos por pruebas serológicas (aglutinación en placa) es dependiente de los días pos-infección y la concentración del microorganismo, se detecta ADN a los 3 días pos infección y serología positiva entre el día 10 al 35 (Feberwee *et al.*, 2005). Lo cual nos puede sugerir que 3.33% de las muestras positivas por aglutinación en placa y PCR puedan coincidir con este periodo, pero al ser una infección de campo es difícil determinar cuando sucedió la infección y saber si es una respuesta primaria o secundaria a la infección.

8. Conclusión

Se encontró una sero- prevalencia y una infección por aglutinación en placa y PCR, inferior al 50% de las muestras, por lo que no se cumple nuestra hipótesis nula y se rechaza.

Se encontró una sero-prevalencia a anticuerpos anti-*M. gallisepticum* en el 20% de los sueros, la cual consideramos alta debido a que se tomó muestras de aves clínicamente sanas.

En el 57.14% de las galleras se evidencio una serológica positiva a *M. gallisepticum*, lo que demuestra que las aves pueden estar en riesgo constante de infectarse y de enfermarse si interactúan con otros agentes infecciosos o tiene mal manejo.

Se logró estandarizar el PCR punto final para detectar DNA de *Mycoplasma gallisepticum* en secreciones de tráquea con un límite de detección de 10^{-5}

Se detectó ADN de *M. gallisepticum* en el 7.6% de las muestras demostrando la presencia del agente en campo.

Existe una correlación baja entre la aglutinación en placa y la PCR

Dado a que la información obtenida sobre la prevalencia de *M. gallisepticum* en aves de combate es escasa, es difícil de establecer el índice de incidencia y prevalencia de la enfermedad, por lo que es necesario establecer un plan de vigilancia epidemiológica.

9. Referencias

- Asgharzade S, Sima Z, Majid H, Malahat A, Reza TA. 2013. Detection of *Mycoplasma gallisepticum* in experimentally infected broiler chickens using Culture, SPA, ELISA, and PCR methods. *Comp. Clin. Pathol.*22:1051–1055.
- Breeders RLL, Cardoso ALSP, Stoppa GFZ, Kanashiro AMI, de Castro AGM, Tessari ENC. 2011. Comparative study of serological tests for *mycoplasma synoviae* diagnosis in commercial poultry. *Res. Vete. Med. Inter.* 40: 58-60.
- Casaubon HMT. 2014. Procedimientos de diagnóstico de enfermedades en aves de combate, Curso de actualización en medicina preventiva y bioseguridad en aves de combate 21 y 22 de agosto, Querétaro México.
- Christensen NH, Christine A Yavar, Mcbain AJ, Janet M Bradbury. 1994. Investigations into the survival of *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma iowae* on materials found in the poultry house environment. *Avian Pathol* 23: 127-14.
- Daniel W. 2006. Bioestadística. Capítulo 9. 400- 477 Cuarta edición. Limusa Wiley.
- Feberwee A, Mekkes DR, de Wit JJ, Hartman EG, Pijpers A. 2004. Source Comparison of Culture, PCR, and Different Serologic Tests for Detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* Infections. *Avian Dis*, 49: 260-268.
- Feberwee A, Mekkes DR, Klinkenberg D, Vernooij JCM, Gielkensand ALJ. 2005. An experimental model to quantify horizontal transmission of *Mycoplasma*. *The Netherlands Avian Pathol* 34: 355-361.
- Garcia M, Nilo IA, Sharon LBC, Kleven SH. 2005. Evaluation and Comparison of Various PCR Methods for Detection of *Mycoplasma gallisepticum* Infection in Chickens. *Avian Dis* 49:125–132.
- García RAL. 2012. Tesis, Principales enfermedades en aves de combate remitidas al departamento de medicina y zootecnia de aves de la Facultad de Medicina

Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Gharaibeh S, Hailat A. 2011. *Mycoplasma gallisepticum* experimental infection and tissue distribution in chickens, sparrows and pigeons. *Avian Pathology* 40:349-354.

Gonzalez A. 2014. Aspectos económicos de las aves de combate, Curso de actualización en medicina preventiva y bioseguridad en aves de combate 21 y 22 de agosto. Querétaro México.

Guerrero ZR. 2014. Aspectos generales de la gallística en México Curso de actualización en medicina preventiva y bioseguridad en aves de combate 21 y 22 de agosto. Querétaro México.

Jordan FTW, Patison M. 2008. Enfermedades de las aves. Jordan FTW. Capítulo II, Micoplasmas aviares. 3° ed: 79-84.

Kleven SH. 2008. Control of Avian Mycoplasma Infections in Commercial Poultry, *Avian Dis* 52:367–374.

Leigh SA, Branton SL, Evans JD. 2012. Effect of infection route and concurrent infectious bronchitis virus vaccination on *Mycoplasma gallisepticum* disease pathology in an experimental model. *Avian Pathol* 41: 497-503.

Ley DH 2008. *Mycoplasma gallisepticum* Infection. Saif Y. M., Fadly A. M., Glisson Jr, Mc Douglas L. R., Nolab L. K., Swayne D. E. *Dis Poult*. 12° ed: 807-834.

Liu JJ, Ding L, Wei JZ, Li Y. 2013. Influences of F-strain *Mycoplasma gallisepticum* vaccine on productive and reproductive performance of commercial parent broiler chicken breeders on a multi-age farm. *Poult Sci* 92:1535–1542.

Much P, Florian W, Renate R, Christine C, 2002. *Mycoplasma gallisepticum*: influence of cell invasiveness on the outcome of experimental infection in chickens. *Immunol and Med Microbio* 34: 181-186.

Noel R., Jhon G. Holt.1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Shmuel Razin, E. A. Freundt. Section 10, The Mycoplamas 1° ed: 759-760.

Nascimento ER, Pereira VLA, Nascimento MGF, Barreto ML. 2005. Avian Mycoplasmosis. *Brazilian J Poul Sci* 7: 1-09.

Nascimento ER, Yamamoto R, Herrick KR, Tait RC. 1991. Chain Reaction for Detection of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis* 35: 62-69.

Padilha FA, Tatiana de V, Nilo I, Kazantzi FAS, Celmer JA, Kanan ME, Vagner RL. 2013. A Multiplex real-time PCR for detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in clinical samples from Brazilian commercial poultry flocks Brazil. *Brazilian J Microbio* 44: 505-515.

Salisch H, Ryll M, Hinz KH, Neumann U.1999. Experiences with multispecies polymerase chain reaction and specific oligonucleotide probes for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. *Avian Pathology* 28, 337-344.

Sasipreeyajan J, Halvorson AD, Newman JA.1987. Effect of *Mycoplasma gallisepticum* Bacterin on Egg-Transmission and Egg Production. *Avian Dis* 31:776-781.

Snell C, Cullen GA. 1977. The detection of maternal antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* in chicks by the rapid serum agglutination and haemagglutination inhibition tests. *Avian Pathol*, 6: 181-185.

Talavera RM, Celedio VV, Fernández RP, Peña RAH, Soriano VE, Juan MTG. 2012. Sero-prevalencia de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* en aves de combate de la altiplano central de México. *Rev Cien*, 22: 135-138.

The Center for Food Security y Public Health Iowa State University. 2007. Institute for International Cooperation in animal biologics Micoplasmosis aviar (*Mycoplasma gallisepticum*) *Infección Similar a la Pleuroneumonía (PPLo, por sus Siglas en Inglés), Enfermedad Respiratoria Crónica, Sinusitis Infecciosa, Conjuntivitis del Pinzón Mexicano* Última actualización: enero

Tristram GP., Daniels PS., Abba LT. 2001. Inmunología básica y clínica. Clifford Lowell Sección II. Métodos de laboratorio clínico para la detección de antígenos y anticuerpos. 10ªed: 253-260.

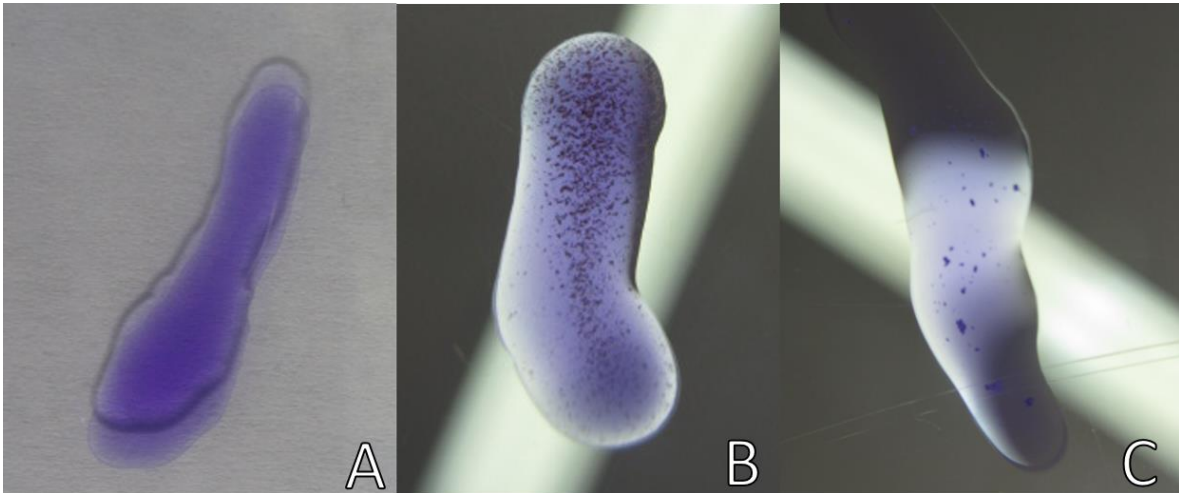
Venosa PFJ. Servicios Técnicos Novartis, Aspectos relevantes de la patogenia y control de la micoplasmosis aviar. 2011. XVII Jornada avícola “Dr. José Antonio Quintana López” FMVZ- UNAM del 16-18 de Febrero pp 149-157.

Wunderwald C, Hoop KR. 2002. Serological monitoring of 40 Swiss fancy breed poultry flocks, *Avian Pathol*31: 157– 162.

Xavier J, Pascal D, Crespo E, Schell HL, Trinidad JA, Bueno DJ. 2011. Seroprevalence of Salmonella and Mycoplasma infection in backyardchickens in the state of Entre Ríos in Argentina. *Poul Scien* 90:746–7

10. Figuras y tablas

Figura 1. Prueba de aglutinación en placa.



En la imagen A se observa una reacción negativa a la presencia de anticuerpos anti-*M.gallisepticum* en suero, la imagen B es una reacción positiva en donde se aprecian aglutinación del antígeno, en la imagen C se observa una reacción inespecífica.

Figura 2. Distribución geográfica de las galerías.

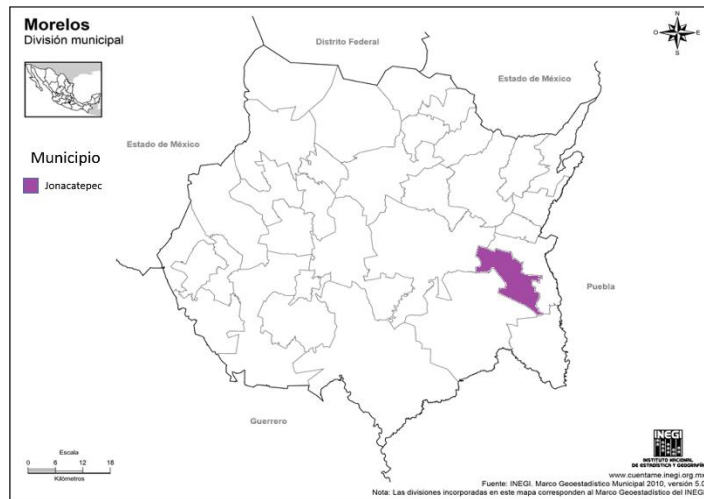
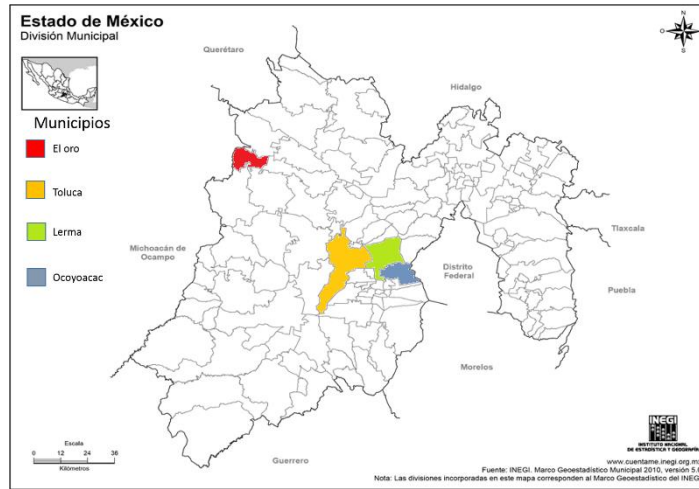
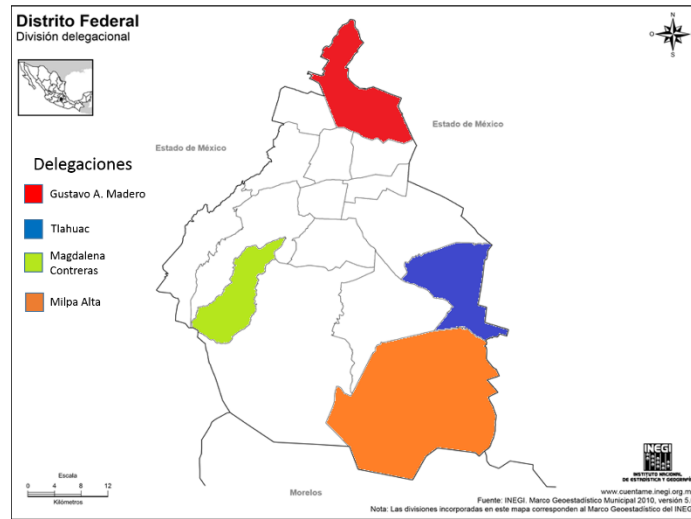


Figura 3. Número de muestras por estado.

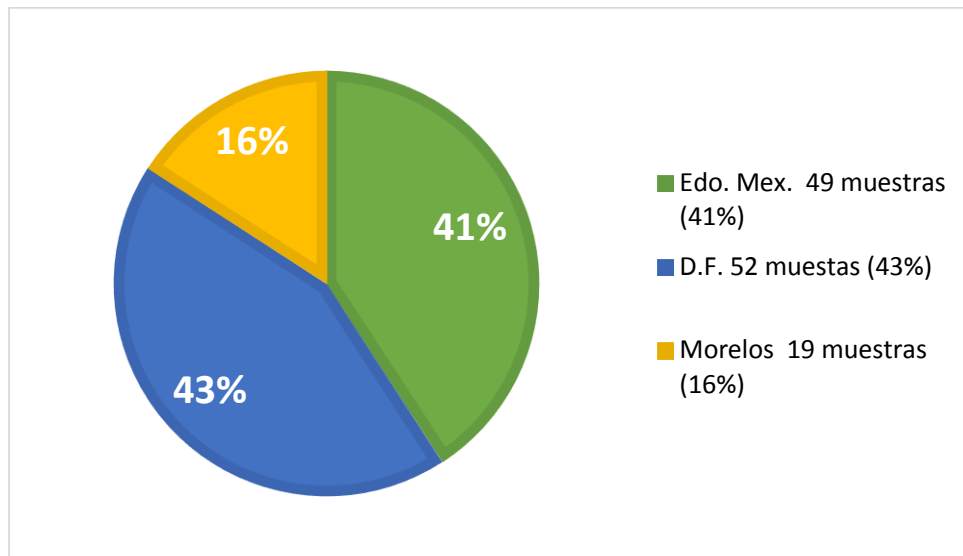


Figura 4. Sero-prevalencia de anticuerpos anti-*M.gallisepticum* por prueba de aglutinación en placa en aves de combate.

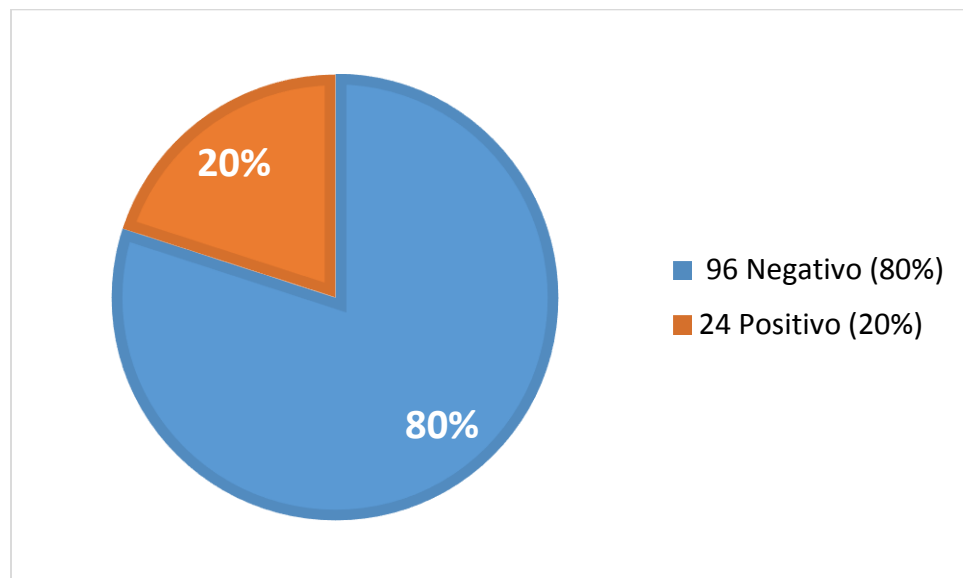


Figura 5. Sero-positivos anti-*M.gallisepticum* por prueba de aglutinación en placa en aves de combate por estado.

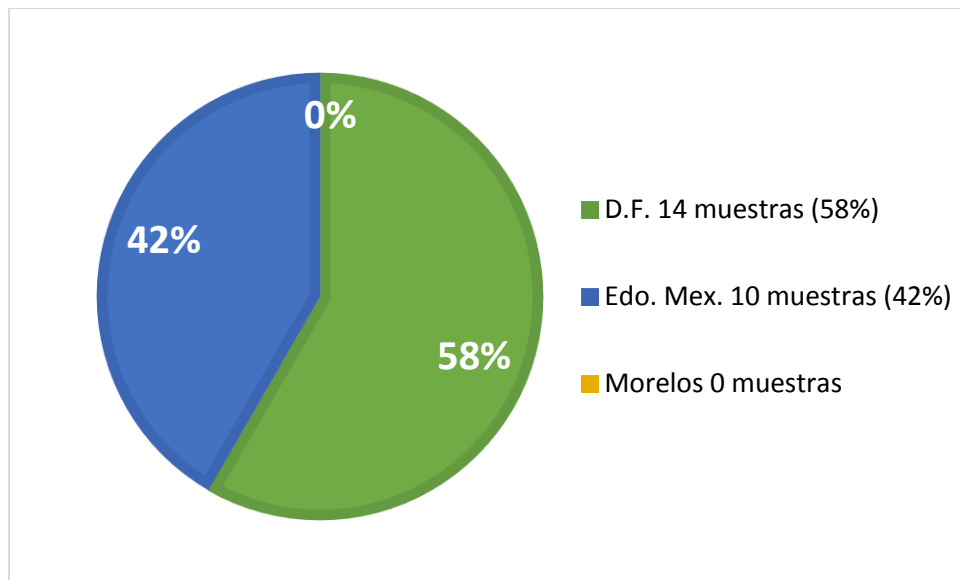
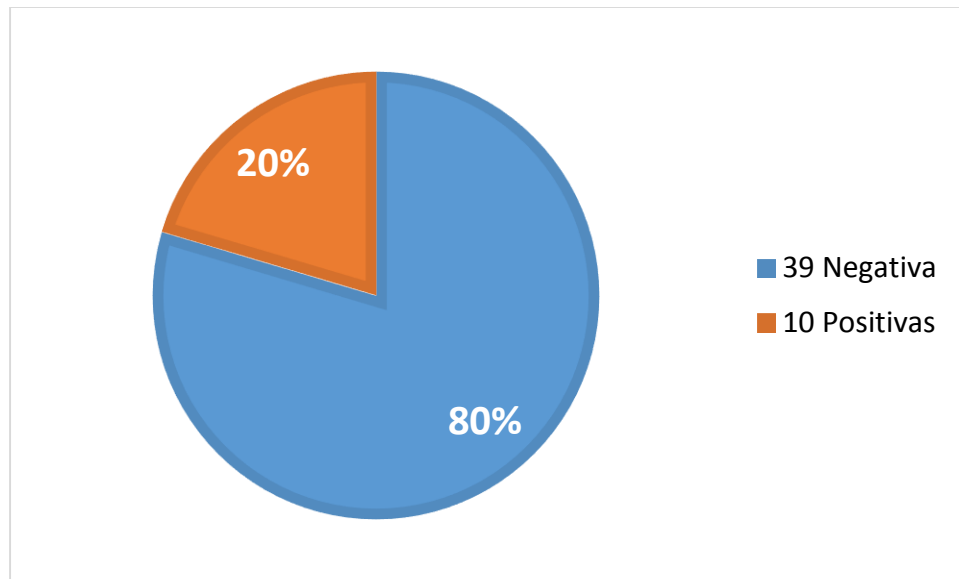


Figura 6. Sero-prevalencia a anticuerpos anti-*M.gallisepticum* por prueba de aglutinación en placa en aves de combate por estado.

Estado de México



Distrito Federal

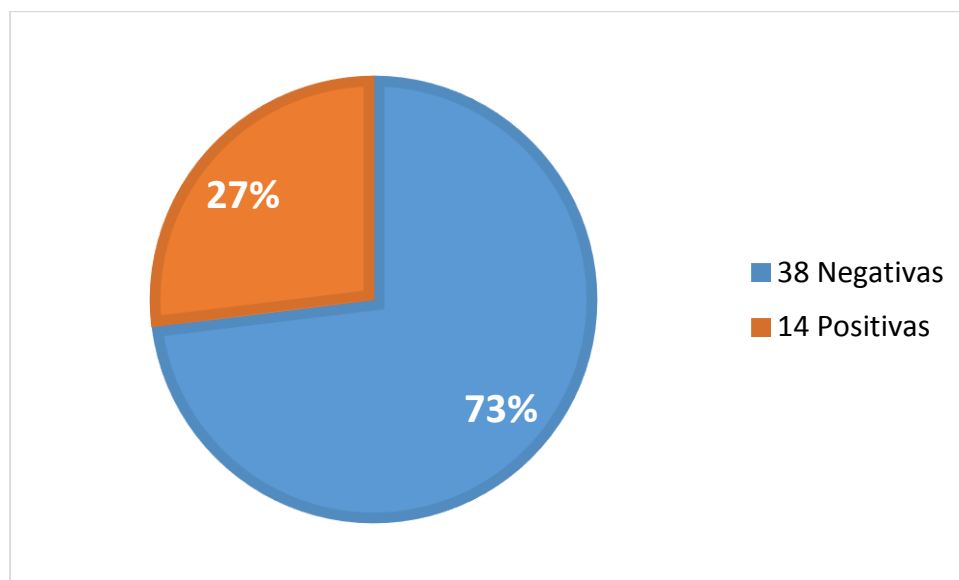


Figura 7. Porcentaje de galleras positivas por aglutinación en placa.

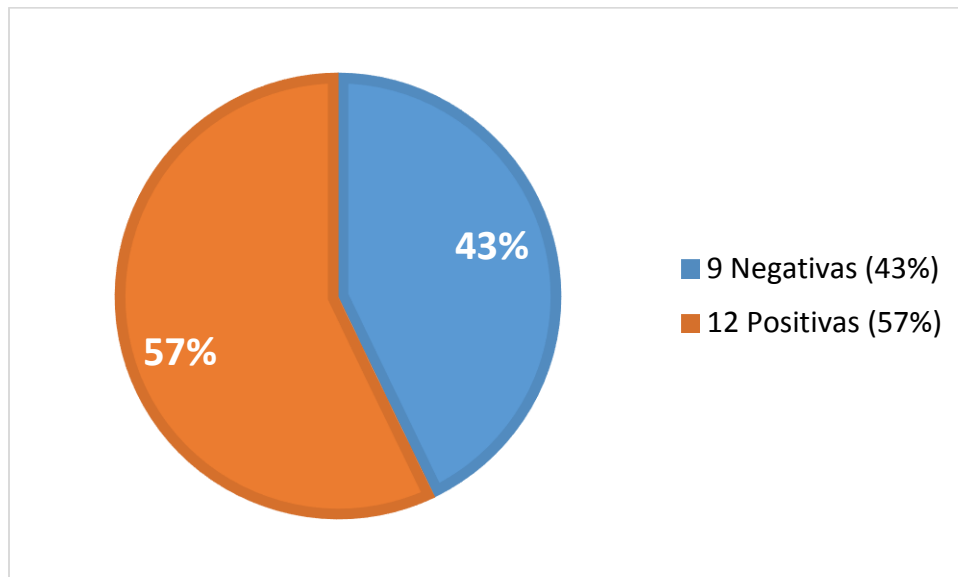


Figura 8. Porcentaje de gallos positivos por PCR para la detección de *M. gallisepticum* en muestras de tráquea.

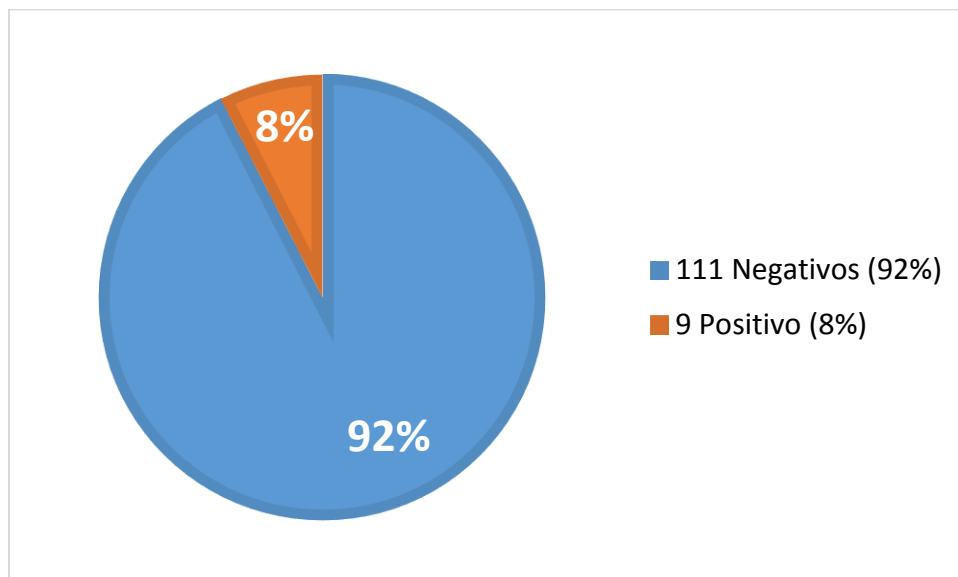
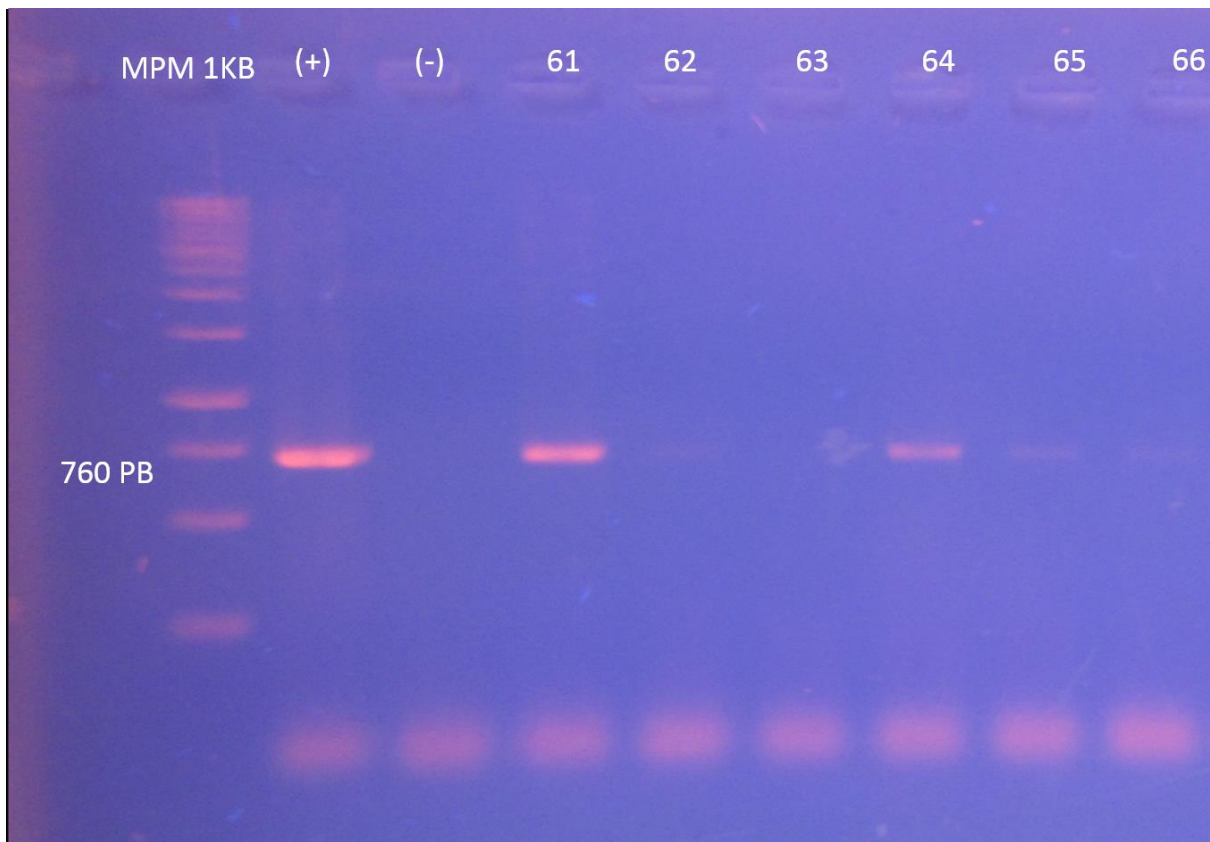


Figura 9. Detección de *M.gallisepticum* en muestras de tráquea.



Carril MPM.- marcador de peso molecular de 1KB. Carril (+).- Control positivo mostrando una amplificación de 760 pb aproximadamente. Carril (-).- Control negativo en donde el DNA fue sustituto por agua estéril. Carril 61-66.- Muestras de tráquea.

Figura 10. Porcentaje de gallos positivos por aglutinación en placa y PCR.

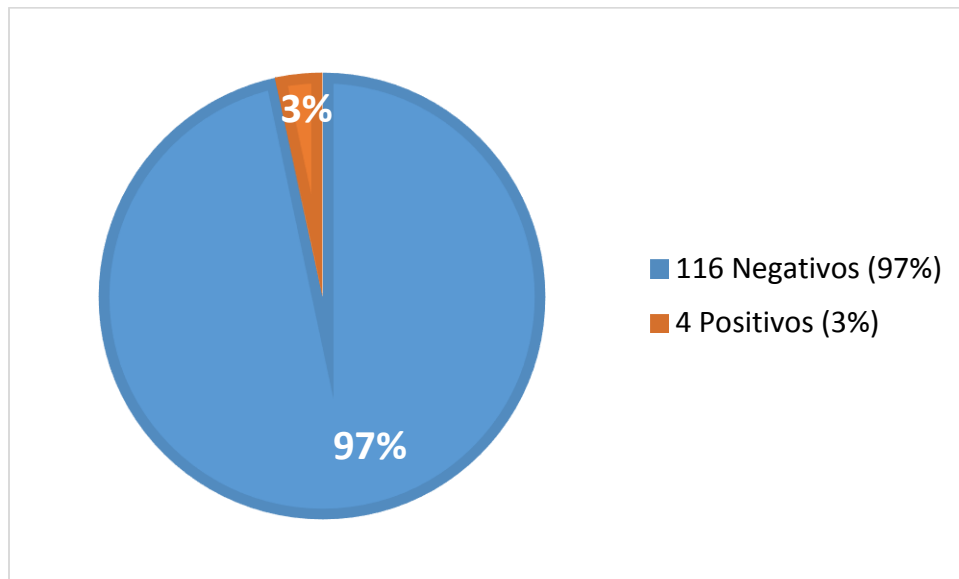
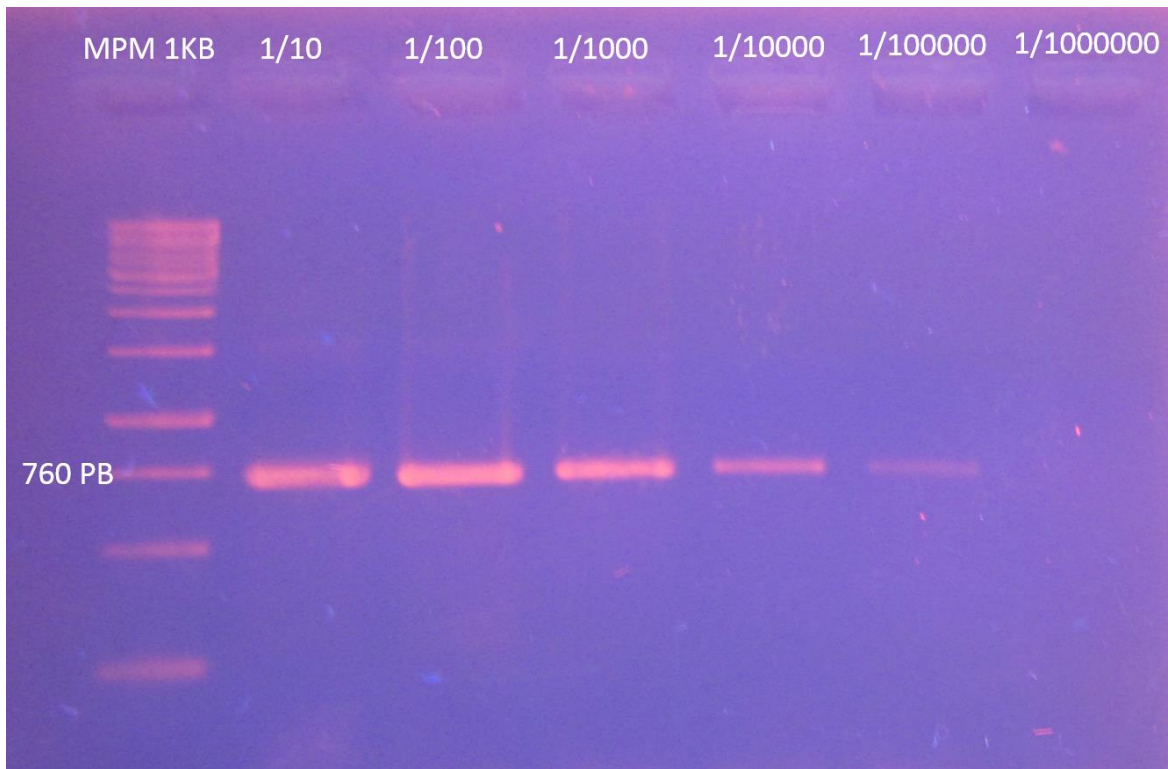


Figura 11. Límite de detección de la PCR punto final



Se realizaron diluciones decuples seriadas de la vacuna F de MG, y fueron utilizadas para establecer el límite de detección de *M. gallisepticum* con el PCR punto final. La dilución más alta en donde se logra amplificar el producto es de 10^{-5} equivalente a 10 UFC.

Tabla 1. Número de muestras por gallera en cada estado y número de casos positivos a prueba de aglutinación en placa y PCR.

Estado de México

N° de Galleas y ubicación	Población de la gallera	N° de muestras por gallera	+ por AP	+ por PCR
1. Lerma	70	7	0	1
2. Toluca	250	25	0	0
3. Ocoyoacac	70	7	6	5
4. El oro	100	10	4	2
Total	490	49	10	8

Estado de Morelos

N° de Galleas y ubicación	Población de la gallera	N° de muestras por gallera	+ por AP	+ por PCR
1. Jonacatepec	190	19	0	1

Distrito Federal

N° de Galleras y ubicación	Población de la gallera	N° de muestras por gallera	+ por AP	+ por PCR
1. A. Madero	23	2	0	0
2. A. Madero	26	2	1	0
3. A. Madero	43	4	1	0
4. Milpa Alta	20	2	2	0
5. Milpa Alta	21	2	0	0
6. Milpa Alta	19	2	0	0
7. Milpa Alta	27	2	1	0
8. Milpa Alta	34	3	2	0
9. Magdalena	20	2	2	0
10. A. Madero	21	2	1	0
11. A. Madero	35	3	0	0
12. A. Madero	20	2	0	0
13. Tlahuac	80	8	0	0
14. A. Madero	52	5	2	0
15. A. Madero	56	5	1	0
16. A. Madero	60	6	1	0
Total	557	52	14	0

Tabla 2. Interpretación de los valores del coeficiente de correlación según el rango de valores.

Coeficiente	Interpretación
0	Relación nula
0-0.2	Relación muy baja
0.2-0.4	Relación baja
0.4-0.6	Relación moderada
0.6-0.8	Relación alta
0.8-1	Relación muy alta
1	Relación perfecta