



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE LA REACCIÓN DE LA
POLIMERASA EN CADENA COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO DE *Mycoplasma
gallisepticum* Y *Mycoplasma synoviae* Y SU APLICACIÓN EN MUESTRAS DE
GALLINAS COMERCIALES EN CHILE**

Carolina Andrea Toledo Meza

Memoria para optar al título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Patología Animal

PROFESOR GUÍA: Héctor Hidalgo

SANTIAGO, CHILE

2016



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA DE LA REACCIÓN DE LA
POLIMERASA EN CADENA COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO DE *Mycoplasma
gallisepticum* Y *Mycoplasma synoviae* Y SU APLICACIÓN EN MUESTRAS DE
GALLINAS COMERCIALES EN CHILE**

Carolina Andrea Toledo Meza

Memoria para optar al título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Patología Animal

NOTA FINAL:.....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA: DR. HECTOR HIDALGO
PROFESOR CONSEJERO: DR. PATRICIO RETAMAL
PROFESOR CONSEJERO: DR. FEDERICO CIFUENTES

SANTIAGO, CHILE

2016

RESUMEN

Mycoplasma gallisepticum (MG) y *Mycoplasma synoviae* (MS) son patógenos que afectan el sistema respiratorio de las aves de producción y pueden ser transmitidos verticalmente a la progenie. Ambos forman parte de la lista de enfermedades de denuncia obligatoria a la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). La medida más efectiva para controlar la enfermedad, ha sido por muchos años la erradicación mediante la mantención de abuelas y reproductoras libres de la infección, generando una progenie libre de MG y MS.

En Chile, el diagnóstico de la micoplasmosis en planteles avícolas es realizado mediante técnicas serológicas capaces de detectar anticuerpos contra MG y MS, utilizando las técnicas de enzimoimmunoensayo (ELISA) e inhibición de la hemoaglutinación (IHA). Además se utiliza la técnica de cultivo y aislamiento bacteriano. Estas pruebas son utilizadas en el Programa de Control de *Mycoplasma sp.* dirigido a los distintos estratos de aves, pertenecientes a empresas avícolas productoras de carne de pollo, carne de pavo y de huevos de mesa.

Al ser MG y MS patógenos de denuncia obligatoria, se vuelve de suma importancia implementar nuevas técnicas de laboratorio capaces de brindar resultados fidedignos y en tiempos acotados. Con el propósito de que, de existir un brote de la enfermedad, se pueda poner en marcha rápidamente las medidas de control propuestas por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG).

La técnica de la Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR), desarrollada más recientemente, ha sido introducida en los laboratorios de diagnóstico de Chile y de otros países como una herramienta útil para analizar el estado sanitario de las aves de corral, principalmente, para confirmar los resultados positivos expresados por las pruebas de

ELISA e IHA. La PCR es capaz de identificar el DNA específico de MG y MS, de forma rápida y certera.

En el siguiente estudio, se buscó implementar un protocolo de PCR en cepas de referencia de MG y MS en un laboratorio de diagnóstico autorizado por el SAG y participante del programa oficial de control de *Mycoplasma sp.* y posteriormente, puesto a prueba en muestras de campo.

Las muestras recolectadas para poner a prueba el protocolo de PCR, fueron tomadas en una población de gallinas de postura comerciales, clínica y productivamente sanas, pertenecientes a un plantel de aves serológicamente positivas a MG y MS mediante la prueba de ELISA.

Para cumplir con el propósito del estudio, se realizó un paso de extracción y purificación del DNA genómico. A continuación se realizó la PCR con partidores diseñados para amplificar un fragmento de la secuencia del gen que codifica para el RNA ribosomal 16S de ambos patógenos. Posteriormente, se realizó la electroforesis de los productos de PCR en gel de agarosa al 2%, a 80 Voltios durante 40 minutos. Finalmente, se visualizaron las bandas de amplificación en un transiluminador UV, dejando registro fotográfico de las imágenes.

El protocolo de PCR puesto en marcha demostró la capacidad de amplificar el DNA de las cepas de referencia, así como el DNA de MG y de MS presente en las muestras de campo.

Palabras clave: *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, PCR, DNA, gallinas de postura.

ABSTRACT

Mycoplasma gallisepticum (MG) and *Mycoplasma synoviae* (MS) are two important pathogens that cause infections of the respiratory system of poultry. Also, they can be transmitted vertically to the progeny. Both are part of the reportable list of diseases to the World Organization for Animal Health (OIE). For many years, the main and most effective measure to control the disease has been the eradication of infection by maintaining batches of Grandparent lines and Parent Stock free of infection and thus generating a progeny free of MG and MS.

The diagnosis of avian mycoplasmosis in poultry in Chile, is performed by serological methods capable of detecting antibodies against MG and MS, using the techniques of Immuno-Assays (ELISA) and hemagglutination inhibition (HI). Also, by employing cell culture and bacterial isolation. These tests are used as a part of the *Mycoplasma sp.* Control Program and are aimed at different types of birds of the Chilean Poultry Industry such as meat chicken, meat turkey and table eggs.

Since MG and MS are pathogens notifiable to the OIE, it is very important to implement new laboratory techniques that are capable of providing reliable and fast results. In order to, in the case of an outbreak of the disease, begin as soon as possible with the control measures proposed by the Agriculture and Livestock Service.

Developed more recently, the assay of Polymerase Chain Reaction (PCR) has been introduced in diagnostic laboratories of Chile and other countries as a useful tool for analyzing the health status of batches of poultry, and mainly, to confirm positive results expressed by the ELISA and HI. PCR test, is able to identify the specific DNA sequences of MG and MS, rapidly and accurately.

In this study, we first implemented a PCR protocol with reference strains of MG and MS in a diagnostic laboratory authorized by the SAG and participant of the official program control *Mycoplasma sp.* and then we tested it with field samples.

Tracheal swabs samples were collected, processed and tested with PCR protocol implemented. The samples were taken from a commercial population of laying hens, clinically and productively healthy, from a farm that was serologically positive to MG and MS by ELISA.

To fulfill the purpose of this study, a preliminary step to extract and purify the genomic DNA was made. Then PCR was performed with primers designed to a fragment of the gene sequence coding for 16S ribosomal RNA of both pathogens. Subsequently, we performed 2% agarose gel electrophoresis, where the PCR products were subjected to a potential difference of 80 volts, for 40 minutes. We finally visualized the amplification bands on a UV lamp and kept photographic records.

The protocol implemented demonstrated the ability to amplify DNA from both reference strains, as well as the DNA present in field samples for PCR of MG and MS.

Key words: *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, PCR, DNA, laying hens.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Resumen	i
Abstract	iii
Índice de contenidos	v
Índice de tablas	vii
Índice de figuras	viii
I. Introducción	1
II. Revisión bibliográfica	4
Taxonomía y caracterización del agente etiológico	4
Signología	6
Patología	8
Epidemiología	9
a. Distribución de la micoplasmosis	9
b. Prevalencia de la micoplasmosis	9
c. Tasas de morbilidad y mortalidad de la micoplasmosis en pollos y gallinas	12
d. Hospederos naturales	13
e. Transmisión de la infección	14
f. Periodo de incubación	15
Patogénesis del proceso infeccioso	16
Diagnóstico	17
a. Aislamiento e identificación del agente etiológico	18
b. Serología	19
c. Técnicas moleculares	21
Diagnóstico diferencial	30
Estrategias de control	32
a. Erradicación de la infección	32
b. Vacunación	36
c. Tratamiento	37
III. Objetivo general	38
IV. Objetivos específicos	38

V. Materiales y métodos	38
1. Materiales.....	38
1.1. Muestras de referencia y muestras de campo de MG y MS.....	38
1.1.1. Cepas estándar referencia para identificación del DNA de MG y MS	38
1.1.2. Muestras de campo para detección molecular del DNA de MG y MS..	39
1.2. Equipamiento	39
1.3. Reactivos y fungibles	40
1.4. Partidores.....	40
2. Métodos	41
2.1. Obtención de las muestras de campo	41
2.2. Procedimiento de laboratorio	42
2.2.1. Extracción y purificación del DNA de MG y MS	42
2.2.2. Determinación de la concentración y pureza del DNA de MG y MS	44
2.2.3. PCR para amplificar fragmento de DNA del gen RNAr16S	44
2.2.4. Electroforesis en gel de Agarosa al 2%	46
VI. Resultados	47
1. Ensayo de la técnica de PCR en cepas de referencia de MG y MS	47
1.1. Reconocimiento molecular de las cepas de referencia de MG y MS	47
1.2. Especificidad de la prueba de PCR para MG y MS	48
1.2.1. Especificidad de la prueba de PCR para MG	49
1.2.2. Especificidad de la prueba de PCR para MS	49
2. Ensayo de la técnica de PCR en muestras de campo de gallinas ponedoras	50
2.1. PCR para MG	51
2.2. PCR para MS	51
VII. Discusión	54
VIII. Conclusión	60
IX. Bibliografía	61
X. Anexos	71
Anexo Nro.1: Geles de electroforesis de productos de PCR de <i>M. gallisepticum</i>	71
Anexo Nro.2: Geles de electroforesis de productos de PCR de <i>M. synoviae</i>	75

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA Nro. 1: Resultados de las muestras sometidas a la prueba de PCR para <i>Mycoplasma gallisepticum</i> y <i>Mycoplasma synoviae</i>	53
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA Nro. 1: PCR para cepas de referencia A5969 de MG y WVU1853 de MS	48
FIGURA Nro. 2: Especificidad de la prueba de PCR para MG y MS	50
FIGURA Nro. 3: PCR para <i>Mycoplasma gallisepticum</i> de las muestras 1 – 6	71
FIGURA Nro. 4: PCR para <i>Mycoplasma gallisepticum</i> de las muestras 7 – 20	72
FIGURA Nro. 5: PCR para <i>Mycoplasma gallisepticum</i> de las muestras 21 – 35	73
FIGURA Nro. 6: PCR para <i>Mycoplasma gallisepticum</i> de las muestras 36 – 50	74
FIGURA Nro. 7: PCR para <i>Mycoplasma synoviae</i> de las muestras 1 – 6	75
FIGURA Nro. 8: PCR para <i>Mycoplasma synoviae</i> de las muestras 7 – 20	76
FIGURA Nro. 9: PCR para <i>Mycoplasma synoviae</i> de las muestras 21 – 35	77
FIGURA Nro. 10: PCR para <i>Mycoplasma synoviae</i> de las muestras 36 – 50	78

I. INTRODUCCIÓN

La micoplasmosis es una enfermedad que afecta principalmente el sistema respiratorio de las aves de corral, produciendo signos tales como estornudos, tos, descarga nasal y estertores traqueales. Es causada por distintas especies de micoplasmas patógenos que tienen la capacidad de ser transmitidos a la progenie de forma transovárica. *Mycoplasma gallisepticum* (MG) y *Mycoplasma synoviae* (MS) son los de mayor importancia económica en la avicultura y son las únicas especies de micoplasmas publicados en la lista de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) como patógenos de declaración obligatoria (Kleven y Bradbury, 2008; Servicio Agrícola y Ganadero, 2014b).

La micoplasmosis puede presentarse de forma más agresiva cuando coexiste con otros patógenos primarios o secundarios, como por ejemplo el virus de la bronquitis infecciosa o *Escherichia coli*, incrementando aún más las pérdidas económicas en la industria avícola mundial. Dichas pérdidas económicas están asociadas a una menor tasa de crecimiento en pollos de engorda, una disminución de la postura y decomiso de carcasas con presencia de aerosaculitis en plantas faenadoras de carne (Buim *et al.*, 2009). La micoplasmosis también puede ocasionar un aumento en los costos del tratamiento farmacológico administrado a las aves enfermas, pérdidas por eliminación de lotes en plena etapa productiva e incluso restricciones comerciales entre países que realizan importación/exportación de huevos fértiles o pollitos de un día (Servicio Agrícola y Ganadero, 2009a).

En Chile, al igual que en Estados Unidos y otros países, las abuelas broilers y de pavos, las reproductoras broilers, de pavos y de gallinas de postura, son sometidas a un plan de monitoreo permanente de micoplasmosis aviar. Estos estratos de aves son considerados libres de MG, MS y *M. meleagridis* y se busca constantemente la mantención de este

estatus sanitario, para evitar la transmisión de forma vertical a la progenie y perpetuar la libertad de esta infección (Servicio Agrícola y Ganadero, 2009a).

En el caso de las explotaciones de gallinas de postura de huevo comercial, MG y MS se consideran patógenos endémicos, debido a que el sistema de crianza de múltiples edades favorece la presencia y la transmisión horizontal de los micoplasmas dentro de la población (Servicio Agrícola y Ganadero, 2014a).

Para evitar la propagación de la infección es que en Chile se realiza un Programa Oficial de Control de *Mycoplasma sp.* dirigido a planteles de aves comerciales, con especial énfasis en abuelas y reproductoras de broiler, reproductoras de pavos y de postura. Este programa es obligatorio para planteles animales bajo certificación oficial (PABCO) y voluntario para otras empresas productoras de aves, forma parte del Programa de Vigilancia Epidemiológica, a cargo de la División de Protección Pecuaria del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) (Servicio Agrícola y Ganadero, 2009).

El Programa Oficial de Control de *Mycoplasma sp.* efectuado por el SAG utiliza las técnicas serológicas de Enzimoimmunoensayo (ELISA) e Inhibición de la Hemoaglutinación (IHA) para monitorear el estado sanitario de las aves. El SAG delega parte de las funciones de este programa, facultando a los Laboratorios Autorizados para realizar la técnica de ELISA en sueros de aves susceptibles (Servicio Agrícola y Ganadero, 2009a). Es así como el Laboratorio de Patología Aviaria (LPA), del Departamento de Patología Animal, de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile participa en este programa oficial de control de *Mycoplasma sp.* para MG, MS y *Mycoplasma meleagridis* (MM) como Laboratorio Autorizado para realizar el diagnóstico serológico mediante la técnica de ELISA. Mientras que la IHA, que posee un mayor grado de especificidad, es utilizada por el Laboratorio Oficial del SAG para confirmar los resultados positivos a MG, MS y MM obtenidos mediante las prueba de ELISA.

No obstante, la serología requiere de a lo menos dos semanas de curso de la infección para lograr un título de anticuerpos suficiente en sangre, para ser detectado por la prueba diagnóstica de acuerdo a su nivel de sensibilidad (Raviv y Kleven, 2009; García *et al.*, 2005). De igual manera que el cultivo y aislamiento de *Mycoplasma sp.*, que es considerado también como prueba confirmatoria de la infección, es un procedimiento lento que puede tardar hasta tres semanas en brindar resultados y que puede verse afectado por la contaminación con micoplasmas saprófitos, volviendo aún más lento el aislamiento (Kleven, 2008).

Si bien ambos tipos de pruebas han resultado útiles para analizar el estado sanitario de los lotes de aves de corral, se necesita de otra herramienta diagnóstica complementaria que pueda entregar resultados fidedignos y de forma más temprana. Especialmente en situaciones de emergencia en que se requiere de la rapidez de la toma de decisiones, como bien sería en el caso de un brote de micoplasmosis en abuelas o reproductoras, en que se necesita de la seguridad y celeridad de los resultados para determinar la eliminación del lote y justificar las consecuencias económicas que ello implica.

Las pruebas moleculares permiten reconocer el material genético de los micoplasmas aviáres, en este caso su DNA, por medio de la Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR), cuyo desarrollo brinda resultados en mucho menos tiempo y a la vez posee alta sensibilidad y especificidad.

Actualmente, en Chile, existe un número insuficiente de laboratorios que ofrecen la PCR u otras técnicas moleculares como herramienta diagnóstica de patógenos como los que producen la micoplasmosis aviar. De esta necesidad surge la idea de implementar la técnica molecular de PCR para MG y para MS en el Laboratorio de Patología Aviaria de la Universidad de Chile, dando origen al presente estudio.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Taxonomía y caracterización del agente etiológico.

Los micoplasmas son bacterias que se encuentran en humanos y en variadas especies de animales, plantas e insectos y muchos de ellos son capaces de causar enfermedad (Razin, 1985; Ferguson-Noel, 2013).

La micoplasmosis aviar es causada por distintos micoplasmas patógenos, principalmente *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synoviae* (MS), *Mycoplasma meleagridis* (MM) y *Mycoplasma iowae* (MI). Los micoplasmas patógenos de mayor importancia para las gallinas de postura, para los pollos broiler y también para los pavos son MG y MS. Mientras que MM y MI causan enfermedad respiratoria solamente en pavos (Kleven y Bradbury, 2008). Sin embargo, un hallazgo más reciente mostró evidencia de infección natural de MM, en reproductores broiler con signología respiratoria y disminución de postura. A pesar de esto, no se ha podido determinar la patogenicidad que ejercería MM en hospederos inusuales como los pollos (Khiari *et al.*, 2011).

Mycoplasma gallisepticum, MS, MM y MI, pertenecen a la clase Mollicutes, Orden Mycoplasmatales, Familia Micoplasmataceae, Genero *Mycoplasma*. Dentro de este género se describen más de 120 especies (Ferguson-Noel, 2013).

Los micoplasmas son los procariontes más pequeños capaces de replicarse en un medio libre de células, su genoma también es pequeño y puede variar entre los 500 a 1000 megadaltons (MDa). Representa el genoma más reducido de los organismos auto-replicantes, por lo tanto, son considerados sistemas de vida mínimos. Su capacidad de codificación se limita a menos de 700 proteínas diferentes, sólo dos veces el número calculado de las proteínas esenciales para el funcionamiento de la célula

hipotéticamente más pequeña, lo que significa también una reducción de rutas metabólicas, y requerimientos nutricionales más complejos. Su DNA posee un contenido bajo de guanina-citosina (G+C) que va entre un 24 y un 35% de moles. Los valores de porcentaje molar o mol% de G+C son herramientas eficaces en la clasificación de Mollicutes y de los procariotas en general, sirviendo como un indicador importante para el establecimiento de nuevas especies (Razin, 1985).

Los micoplasmas carecen de pared celular y están limitados solamente por una membrana plasmática, son frágiles al medio ambiente y sensibles a las sustancias químicas comúnmente utilizadas como desinfectantes, como por ejemplo al fenol, formalina, β -propiolactona y timerosal. Sin embargo, los micoplasmas son resistentes a los antibióticos que actúan sobre la pared celular como son las penicilinas y las cefalosporinas (Bradbury y Morrow, 2008; Ferguson-Noel, 2013).

Las distintas especies de micoplasmas aviares generalmente requieren para su crecimiento medios de cultivo ricos en proteínas, que contengan adicionalmente 10 a 15% de suero animal y necesitan de la presencia de colesterol para su crecimiento. En el caso de MS, éste necesita para su desarrollo la adición de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD).

Las colonias típicas de los micoplasmas son pequeñas (0,1 a 1 mm) suaves, circulares, y planas con una elevación central más densa. Las células individuales varían de 0,2 a 0,5 μm y son básicamente cocoides o cocobasiliformes, pero se han descrito también varillas delgadas, filamentos y forma de anillos (Ferguson-Noel, 2013).

Otra característica útil de MG, MS y MM es la capacidad de aglutinar eritrocitos de pollos o de pavos. Los antígenos hemaglutinantes son utilizados para la prueba serológica de IHA en estas tres especies patógenas mencionadas (Ferguson-Noel, 2013).

El rol indiscutible de los micoplasmas como los organismos auto-replicantes más simples y más pequeños ha impulsado especial interés en dilucidar su lugar en los esquemas de evolución global. Se han propuesto dos modelos contrastantes que podrían explicar la evolución de los micoplasmas. El primer modelo propone que los micoplasmas representan a los descendientes de los organismos que precedieron a la división celular procariota-eucariota, o, en otras palabras, los micoplasmas existentes son los descendientes sobrevivientes de bacterias muy primitivas que existían antes del desarrollo de una pared celular basada en el peptidoglicano. El segundo modelo afirma que los micoplasmas representan formas degeneradas de eubacterias, por lo tanto, se puede considerar como producto de un desarrollo más bien tardío en la evolución. Por lo que los micoplasmas descenderían de varias bacterias progenitoras o de una rama de bacterias gram positivas que contempla también a los *Clostridium* (Razin, 1985).

Signología.

Mycoplasma gallisepticum es la causa principal de la denominada “enfermedad respiratoria crónica” de las aves domésticas, se produce especialmente en presencia de manejo estresante y/u otros patógenos respiratorios, como el virus de la bronquitis infecciosa, la enfermedad de Newcastle o *Escherichia coli* (Kleven y Bradbury, 2008; Raviv y Ley, 2013).

Los signos más característicos que ocurren en aves adultas por causa de la infección natural de MG son de naturaleza respiratoria, como por ejemplo: estertores traqueales, descarga nasal, tos, conjuntivitis, respiración dificultosa y aerosaculitis. También se puede reducir el consumo de alimento y con ello, las aves pierden peso. Pese a todo lo anterior, los lotes también pueden tener evidencia serológica de la infección sin tener signos clínicos evidentes de la enfermedad, especialmente si se produce la infección a una edad temprana y han logrado recuperarse parcialmente (Islam *et al.*, 2011; Raviv y Ley, 2013). Cuando hay patógenos asociados a MG, las lesiones suelen ser más graves, prolongando la enfermedad

y dando lugar a una condición crónica. Con la infección de *Escherichia coli* puede ocurrir colisepticemia, pericarditis, perihepatitis y aerosaculitis fibrinocaseosa, que resultan en una alta mortalidad y en decomisos de las canales de las aves (Bradbury y Morrow, 2008; Raviv y Ley, 2013).

La infección producida por MS en pollos puede causar signología de tipo respiratoria y también de tipo articular (Bradbury y Morrow, 2008). Las aves infectadas por vía respiratoria pueden presentar estertores leves, o bien pueden ser asintomáticos. La mayoría de las lesiones en los sacos aéreos ocurren en la temporada de invierno, al igual que con MG, pudiendo ocurrir a cualquier edad, pero tiende a ser más observada a causa del decomiso de las canales al momento de la faena. En la progenie de los reproductores infectados por MS, puede haber un aumento del decomiso de las canales por presencia de aerosaculitis. Puede haber reducción de la ganancia de peso y reducción de la eficiencia de conversión alimenticia. Es frecuente ver excremento de coloración verdosa, la que contiene grandes cantidades de ácido úrico o uratos. Estos signos agudos pueden seguir una lenta recuperación. En algunas instancias, la fase aguda se ausenta o es subclínica y se puede ver solo aves crónicamente infectadas en el lote. Los signos articulares producidos en pollos afectados por MS corresponden a sinovitis, cojera, crecimiento retardado, en algunos casos bursitis esternal y a pesar de que las aves se recuperen del cuadro, la sinovitis podría permanecer durante el resto de la vida de las aves (Ferguson-Noel y Noormohammadi, 2013).

En los lotes de gallinas ponedoras infectadas por MG, se describe básicamente la misma signología respiratoria que en pollos. También se ha asociado la presencia de *Escherichia coli* con la presentación de peritonitis o salpingitis, lo que produce un exudado caseoso a nivel del oviducto, que finalmente termina por aumentar las tasas de mortalidad de las gallinas. Usualmente la producción de huevos decae y se mantiene en un nivel bajo (Raviv y Ley, 2013). La infección natural de MS provocaría escaso efecto sobre la producción o la calidad de los huevos (Ferguson-Noel y Noormohammadi, 2013). Sin embargo, Feberwee

y colaboradores, en un estudio realizado en gallinas de postura con evidencia serológica de la infección por MS, en gallinas inoculadas con MS, lograron relacionar la presencia de MS a nivel del oviducto con la presencia de anomalías apicales en la cáscara de huevo, tales como cascara rugosa, adelgazamiento de la cáscara y grietas, pero manteniéndose la calidad interna del huevo (Feberwee *et al.*, 2009).

Patología:

Las lesiones macroscópicas producidas por MG a nivel del sistema respiratorio consisten en congestión de la mucosa y exudado catarral en los conductos nasales y paranasales, tráquea, bronquio y sacos aéreos. Sinusitis con acumulación de exudado mucoso a caseoso (esto es más observado en pavos que en pollos o que en otros hospederos afectados). Los sacos aéreos frecuentemente contienen exudado y puede ser de distribución focal, multifocal o difusa y en algunos casos se puede observar distintos grados de neumonía. En casos de enfermedad avanzada y severa en pollos y pavos, existe una triada compuesta por aerosaculitis caseosa, perihepatitis fibrinosa y pericarditis, que puede derivar en una alta mortalidad y en cuantioso decomiso durante la faena de las canales. Sin embargo, este tipo de lesiones puede ocurrir junto con otros agentes y no son patognomónicas de MG (Raviv y Ley, 2013).

La patología microscópica revela que en la tráquea, MG se adhiere a las células epiteliales inflamadas y produce destrucción de los cilios. Los micoplasmas se encuentran predominantemente en el espacio extracelular y sólo en raras ocasiones en vacuolas fagocíticas de las células epiteliales, los micoplasmas pueden adherirse a las membranas de las células epiteliales mediante sus organelos de fijación (Raviv y Ley, 2013).

En gallinas de postura comerciales afectadas por MG, se ha observado el oviducto distendido con presencia de exudado (salpingitis) y ha sido asociado con disminución de la

producción de huevos en lotes infectados por MG, esta se caracteriza por un marcado engrosamiento de la mucosa del oviducto, debido a una hiperplasia del epitelio y una marcada infiltración linfoplasmocítica (Raviv y Ley, 2013).

Generalmente no hay lesiones macroscópicas causadas por MS en el tracto respiratorio superior. Aunque si se presenta la forma respiratoria de la enfermedad, puede haber aerosaculitis. Los sacos aéreos pueden tener lesiones leves como edema, proliferación capilar y acumulación de heterófilos (Ferguson-Noel y Noormohammadi, 2013).

En pollos que presentan sinovitis infecciosa en las primeras etapas de la enfermedad, se puede ver exudado viscoso color crema que envuelve las membranas sinoviales de las vainas tendinosas, articulaciones y bursa esternal. A medida que la enfermedad progresa, puede extenderse a los músculos y sacos aéreos (Ferguson-Noel y Noormohammadi, 2013).

Epidemiología:

a. Distribución de la micoplasmosis aviar.

Se considera que MG y MS están distribuidos a nivel mundial (Raviv y Ley, 2013; Ferguson-Noel y Noormohammadi, 2013). En Chile ha sido notificada a la OIE la presencia de MG y MS en aves comerciales, en su calidad de patógenos de denuncia obligatoria, en el último informe anual publicado en el año 2014 (Servicio Agrícola y Ganadero, 2014c).

b. Prevalencia de la micoplasmosis aviar.

Diversos estudios han señalado que entre los dos micoplasmas aviarios de mayor importancia económica, MG y MS, es MS el que tiene una mayor prevalencia en los lotes

de aves comerciales, esto probablemente sea influenciado por el énfasis que se ha puesto en MG en los programas de control de micoplasmosis aviar aplicados en distintos países (Mohammed *et al.*, 1986; Buim *et al.*, 2009).

En aves de postura, la infección producida por MG y MS es muy difícil de erradicar de las granjas de edades múltiples, esto debido a que las aves infectadas quedan como portadoras, perpetuando la transmisión horizontal (Raviv *et al.*, 2007). Esto se ha visto favorecido también por la expansión de los lotes de aves y la concentración de los complejos de producción de edades múltiples dentro de un área geográfica limitada, haciendo cada vez más difícil mantener los lotes libres de la infección. Raviv y colaboradores, han visto que en la industria de huevos de mesa, la mayoría de las pollitas de un día de edad y en fase de crecimiento son libres de MS, pero estas se infectan después de su introducción en los complejos de postura de edades múltiples (Raviv *et al.*, 2007). La infección por MG es considerada endémica en las unidades de gallinas de producción de huevo comercial de edades múltiples. Pequeños lotes de aves de traspatio que pueden estar infectados subclínicamente, representarían una fuente de infección para las aves comerciales (Raviv y Ley, 2013).

No obstante, MG y MS han logrado ser erradicados de la mayoría de las operaciones de engorde, a través de la eliminación de la reproducción de los lotes de abuelas y reproductoras infectadas y manteniendo pollos y pavos de engorda positivos bajo estrictas normas de bioseguridad, evitando la transmisión horizontal (Ewing *et al.*, 1996). Se ha descrito también, que en Estados Unidos, la incidencia en aves de corral comerciales ha disminuido considerablemente durante los últimos 50 años, como resultado del Programa Nacional de Mejoramiento Avícola (NPIP). El NPIP ha sido especialmente eficaz en el control de infecciones en lotes de abuelas y reproductoras de pollos y pavos, hoy en día, la mayoría se consideran libres de la infección (Anón., 1984).

Sin embargo, se han seguido notificando brotes esporádicos en lotes de reproductoras o aves de engorda en países que cuentan con programas de control de micoplasmosis y que presentan altos niveles de bioseguridad, como es el caso de los Estados Unidos (Ewing *et al.*, 1996; Charlton *et al.*, 1999b; Raviv y Ley, 2013; Ferguson-Noel y Noormohammadi, 2013), Brasil (Buim *et al.*, 2009; Mettifogo *et al.*, 2006) o Alemania (Salish *et al.*, 1999). Así también como en países donde la prevalencia de la micoplasmosis aviar es más alta, como es el caso de países como Pakistán (Hanif y Najeeb, 2007; Islam *et al.*, 2011) e Irán (Pourbakhsh *et al.*, 2010), entre otros.

Datos de origen nacional, recopilados por la Unidad de Vigilancia y Control de Enfermedades del Servicio Agrícola y Ganadero de Chile a través del Programa Oficial de Control de *Mycoplasma sp.*, en muestras de sueros de aves de producción, pertenecientes a los estratos de abuelas broilers, reproductoras broilers y pavos, engorda broiler y pavos, reflejaron lo siguiente: De un total de 26.460 muestras para MS y MG y 5.888 para MM analizadas en Laboratorios Autorizados durante el año 2014 (entre ellos, el Laboratorio de Patología Aviaria de la Universidad de Chile), resultaron 192, 588 y 59 muestras de sueros para MG, MS y MM, respectivamente, positivas a la prueba de ELISA. Estas fueron enviadas al Laboratorio Oficial del SAG para su confirmación mediante la prueba de IHA. Los resultados mostraron que no hubo reaccionantes para MG ni para MS en las 12 unidades epidemiológicas de abuelas broilers analizadas. En el caso de reproductores de pavos se registró una unidad epidemiológica reaccionante a MS mediante ELISA e IHA, de un total de 27 unidades epidemiológicas analizadas (3,7%). En el mismo estrato, las muestras para MM todas fueron negativas. En el caso de reproductoras broilers, 10 unidades fueron reaccionantes a MS mediante ELISA e IHA, de un total de 128 unidades analizadas (7,8%). El resultado final del ejercicio 2014 mostró que MS sigue siendo el micoplasma predominante en Chile y mostró que tanto MG y MM están ausentes a nivel de los estratos de abuelas y reproductoras broilers, así como en reproductoras de pavos comerciales (Servicio Agrícola y Ganadero, 2014a).

Desafortunadamente, no se cuenta con datos oficiales publicados por el SAG en aves de postura de huevo comercial. Esto debido a que no existe la obligatoriedad de adscribirse al Plan Oficial de Control de *Mycoplasma sp.* en planteles de ponedoras, siendo de carácter obligatorio solamente para planteles PABCO (Servicio Agrícola y Ganadero, 2009a). La infección por MG y MS en planteles de gallinas de postura es considerada endémica y difícil de erradicar (Servicio Agrícola y Ganadero, 2014a), debido a la organización estructural de los planteles de postura en predios de múltiples edades –lo que se contrapone al modelo organizacional *all in all out* aplicado en broilers y pavos–, esta distribución aumenta las posibilidades de contacto indirecto entre las aves jóvenes con las aves adultas, favoreciendo la transmisión horizontal de patógenos como MG y MS. Es por esta causa que no se ha dado énfasis en el control de la micoplasmosis aviar en este estrato de aves, y consecuentemente existe menos información disponible.

Alternativamente, existe un estudio realizado recientemente en Chile, que determinó la seroprevalencia de MG y de MS en una empresa de postura de huevo comercial, utilizando la prueba de ELISA. Los resultados mostraron que de un total de 453 sueros analizados, 52,8% fueron positivos a MG y 71,1% fueron positivos a MS, concordando con los datos recolectados por el SAG, que señala que MS tiene una mayor prevalencia que MG en Chile. También, se llevó a cabo un análisis estadístico diferenciado por grupo etario, que refleja que a medida que aumenta la edad, existe una mayor prevalencia de MG y de MS en los lotes de aves de postura, iniciando en un 44,6 % para MG y un 36,7% para MS en el grupo etario más joven, llegando a un 70,1% de prevalencia para MG y un 94,0% de prevalencia para MS en las aves del grupo etario más viejo (Castillo, 2015).

c. Tasas de morbilidad y mortalidad de micoplasmosis aviar en pollos y gallinas comerciales.

En pollos broilers, cuando existen brotes de micoplasmosis causada por MG, la infección puede afectar a casi a todas las aves del lote, pero la enfermedad puede variar en severidad

y en duración. Esta tiende a ser más severa y de más larga duración en los meses más fríos, tiende a afectar a aves más jóvenes y de forma más severa en comparación con aves maduras. La mortalidad puede variar desde escasa, con una enfermedad simple, o llegar hasta un 30% en brotes complicados, especialmente durante los meses más fríos (Raviv y Ley, 2013). La morbilidad de los lotes afectados por sinovitis, producida por MS, varía de un dos a un 75%, siendo más usual entre un cinco y un 15%. La presentación respiratoria es generalmente asintomática, pero el 90 a 100% de las aves pueden estar infectadas. La mortalidad usualmente es menor al 1%, pudiendo llegar hasta un 10% (Ferguson-Noel y Noormohammadi, 2013).

La morbilidad de MG y MS en lotes de gallinas de postura puede ser tan alta como la que se presenta cuando han ocurrido brotes en lotes de pollos broiler, el curso de la infección acontece básicamente de la misma forma. La mortalidad causada por MG puede ser baja en ponedoras adultas, pero puede haber una reducción en la producción de huevos, conllevando una considerable pérdida económica, sin embargo, cuando está asociada con patógenos secundarios como *Escherichia coli*, la tasa de mortalidad en ponedoras puede aumentar considerablemente (Raviv y Ley, 2013). La presentación de MS como cuadro respiratorio generalmente no ocurre, pero la infección puede estar presente en más del 90% de las aves. La sinovitis clínica producida por MS puede variar bastante en número, pero por lo general afecta alrededor de un 10% de las aves. La mortalidad frecuentemente es menor a un 1% de la población (Ferguson-Noel y Noormohammadi, 2013).

d. Hospederos Naturales.

La infección por MG ocurre fundamentalmente en gallináceas, particularmente en pollos y pavos. Sin embargo, MG ha sido también aislada desde infecciones naturales en faisanes, perdices de chukar, perdices grises, pavos reales, codornices y codornices japonesas, patos, gansos, loros amazonas de cabeza amarilla, flamencos y cuervos (Ley *et al.*, 1996; Grodio *et al.*, 2012; Stipkovits y Szathmary, 2012; Raviv y Ley, 2013).

Los pollos y los pavos son los hospederos naturales de MS, pero además se ha encontrado infección de forma natural en patos, gansos, gallinas de guinea, gorriones, codorniz japonesa, faisanes y perdices de patas rojas (Poveda *et al.*, 1996; Stipkovits y Szathmary, 2012; Ferguson-Noel y Noormohammadi, 2013).

e. Transmisión de la infección.

MG y MS pueden ser transmitidos a otras aves de forma horizontal y de forma vertical. Es de suma importancia tener claro que pueden ser traspasados por vía ovárica, para tomar las medidas correspondientes y evitar la diseminación de la enfermedad a la progenie (Raviv y Ley, 2013; Ferguson-Noel y Noormohammadi, 2013).

La transmisión horizontal de MG ocurre por contacto directo o indirecto, desde aves susceptibles hacia aves infectadas clínica o subclínicamente. En aves jóvenes, el tracto respiratorio alto y/o la conjuntiva son los portales de entrada para los organismos en forma de aerosoles o de gotas. MG raramente sobrevive más de unos pocos días fuera del hospedero, por lo que las aves portadoras clínicas o subclínicas son esenciales para la epidemiología de la enfermedad. Sin embargo, también la transmisión y los brotes de enfermedad pueden ocurrir a través de fomites como el polvo, gotas, o plumas, junto con la bioseguridad sub-óptima y las malas prácticas del personal (Raviv y Ley, 2013).

La transmisión vertical de MG hacia la progenie ocurre como secuela de una infección respiratoria aguda en las reproductoras, debido a la contigüidad de los sacos aéreos abdominales hacia el oviducto (Levisohn y Kleven, 2000).

En MS la transmisión horizontal ocurre por contacto directo, los brotes de MS se transmiten más rápidamente que los de MG. La transmisión se produce a través del tracto

respiratorio y por lo general el 100% de las aves se infectan, aunque ninguna o sólo unas pocas aves desarrollan lesiones articulares (Ferguson-Noel y Noormohammadi, 2013).

La transmisión vertical juega un papel importante en la propagación de MS en los pollos y gallinas ponedoras. Cuando los lotes de reproductores comerciales se han infectado durante la postura, la transmisión hacia los huevos suele ser más alta durante las primeras cuatro a seis semanas después de la infección. A partir de ese momento la transmisión hacia los huevos puede cesar, pero los lotes infectados pueden diseminar la infección en cualquier momento (Ferguson-Noel y Noormohammadi, 2013). Del mismo modo, Raviv y colaboradores afirman que a raíz de la infección producida por MS, las aves se vuelven portadoras por toda su vida (Raviv *et al.*, 2007).

Se han evaluado una serie de factores que podrían estar asociados a la presencia de la infección de MG y MS en gallinas de postura de huevo comercial. La transmisión horizontal de MG y MS se vería favorecida por el aumento del número de contactos de las aves con los humanos, que actuarían como un vector mecánico de la infección; la organización de las granjas en unidades de múltiples edades tendrían mayor riesgo de adquirir la infección que las unidades *all in all out*; el movimiento de maquinaria entre distintos lotes favorecería las infecciones; la presencia de aves silvestres en áreas cercanas; la remoción infrecuente de las deyecciones, que aumentaría el nivel de humedad del ambiente; la limpieza y desinfección insuficientes al término de cada ciclo productivo; predispondrían a un mayor riesgo de infección (Mohammed *et al.*, 1987).

f. Periodo de incubación.

En infecciones experimentales por MG en pollos, el período de incubación varía de seis a 21 días. En condiciones naturales, el desarrollo de los signos clínicos puede ser muy variable en función de la virulencia de la cepa, la presencia de infecciones concomitantes y

factores de estrés ambientales. Los pollos suelen desarrollar infecciones clínicas cercanas al inicio de la producción de huevos, en respuesta a los factores de estrés (Raviv y Ley, 2013).

La infección por MS se ha visto en polluelos de seis días de edad, lo que sugiere que el período de incubación puede ser relativamente corto en las aves infectadas transováricamente. Tras la exposición por contacto, el periodo se extiende generalmente de los 11 a los 21 días (Ferguson-Noel y Noormohammadi, 2013).

Patogénesis del proceso infeccioso.

Mycoplasma gallisepticum es considerado como un parásito primario de la superficie del tracto respiratorio y de la conjuntiva, aunque la diseminación a otros órganos indica que ocurren infecciones sistémicas transitorias, resultando en enfermedades agudas y crónicas en múltiples sitios (Raviv y Ley, 2013).

La unión de los micoplasmas a las células hospederas es un prerrequisito para acceder a una colonización, infección y patogénesis exitosa y es considerada como un factor de virulencia importante. MG es un organismo que se une a las células epiteliales a través de sus organelos de fijación (Raviv y Ley, 2013).

En cultivo de tejidos, se encontró que MG es capaz de entrar a las células hospederas no fagocíticas, una propiedad que podría proporcionar al organismo la oportunidad de resistir a las defensas del hospedero y a la terapia antibiótica selectiva, estableciendo infecciones crónicas que pasan a través de la barrera de la mucosa respiratoria para causar infecciones sistémicas (Winner *et al.*, 2000; Raviv y Ley, 2013).

Los cambios en la superficie del epitelio traqueal, inducidos por la infección por MG *in vivo* o *in vitro*, incluyen liberación de gránulos mucosos seguidos por destrucción y exfoliación de cilios y de células epiteliales no ciliadas (Lam, 2003; Raviv y Ley, 2013).

En ausencia de factores de estrés ambientales exacerbados o de infecciones con otros agentes patógenos, la infección por MG en la tráquea puede ser autolimitante, pero los organismos pueden persistir (estado de portador), incluso en la presencia de anticuerpos humorales o locales (Kleven, 1985; Raviv y Ley, 2013).

La patogenicidad de las cepas de MS generalmente implican la fijación y la colonización de las vías respiratorias superiores (Ferguson-Noel y Noormohammadi, 2013). Los aislados de MS extraídos a partir de lesiones en los sacos aéreos son más propensos a causar aerosaculitis, mientras que los aislados de líquido sinovial son más propensos a producir sinovitis (Kleven *et al.*, 1975). Las lesiones en los sacos aéreos pueden aumentar en gran medida por las temperaturas ambientales bajas (Springer *et al.*, 1974; Ferguson-Noel y Noormohammadi, 2013).

Diagnóstico

El diagnóstico de MG y MS se realiza principalmente en base a tres tipos de análisis: a) El aislamiento e identificación bacteriana, b) la detección de anticuerpos específicos contra MG y MS, mediante métodos serológicos y c) la identificación molecular de los ácidos nucleicos de las bacterias (Raviv y Kleven, 2009). La prueba *gold standard* para diagnosticar la infección por MG y MS es el aislamiento e identificación del organismo (Raviv y Ley, 2013).

a. Aislamiento e identificación del agente etiológico:

Para cultivar MG, las suspensiones de exudado traqueal o de sacos aéreos, cornetes, pulmones o exudado sinusal deben ser inoculados directamente en caldos para micoplasmas y/o medios de agar. También pueden utilizarse torulados de tráquea o de seno palatino para el cultivo de MG, y del mismo modo, pueden emplearse muestras provenientes del oviducto y de la cloaca de pavos y de pollos (Raviv y Ley, 2013).

Durante las etapas agudas de la infección por MG (generalmente en las primeras cuatro a ocho semanas post infección), la población de MG en el tracto respiratorio superior y la prevalencia de la infección en el lote de aves es alto. Por lo tanto, las tómulas de tráquea o seno palatino de 10-20 aves vivas son usualmente suficientes para recuperar el organismo, mientras que 30 a 100 cultivos pueden ser requeridos en etapas posteriores de la infección. El número de organismos presentes en la tráquea o en seno palatino en aves infectadas crónicamente, como en ponedoras de huevos comerciales o aves de traspatio, puede ser tan baja que el organismo (MG) puede no ser detectado mediante métodos de muestreo y de cultivo habituales (Raviv y Ley, 2013).

El diagnóstico positivo de MS puede ser hecho por aislamiento e identificación. MS puede ser aislado de lesiones durante la fase aguda de la enfermedad, pero más seguro en aves infectadas crónicamente ya que en esta condición, la infección del tracto respiratorio alto es permanente (Ferguson-Noel y Noormohammadi, 2013).

Idealmente, los caldos para micoplasmas deben ser inoculados directamente con las muestras de las aves e incubadas inmediatamente a 37°C. Si a corto plazo el almacenamiento y/o el transporte son necesarios, se deben mantener los caldos inoculados a 4°C o en *ice packs* (no más de 24 horas) (Raviv y Ley, 2013).

Las muestras de caldos de cultivo se pueden transferir a un medio de agar micoplasma para permitir la formación de colonias. A las cuales se les puede practicar la prueba de inmunofluorescencia directa o indirecta, o inmunoperoxidasa para la identificación de *Mycoplasma sp.* (Raviv y Ley, 2013).

Como se mencionó anteriormente, la prueba *gold standard* para el diagnóstico de MG es el aislamiento e identificación de la bacteria. Sin embargo, MG es de lento crecimiento y es un organismo relativamente fastidioso y podría requerir sobre tres semanas para observar su desarrollo. En algunos casos, el aislamiento de MG en los cultivos es afectado por el crecimiento excesivo de micoplasmas saprófitos que habitan el tracto respiratorio alto de especies aviares, o bacterias u hongos que no han logrado ser inhibidos exitosamente por los medios selectivos de micoplasmas (García *et al.*, 2005; Raviv y Ley, 2013).

Los cultivos puros de micoplasma aviares pueden ser también usados para definición de especie mediante los genes RNA ribosomal 16S o por la región espaciadora intergénica RNAr 16S-23S mediante PCR, seguido por secuenciación genética. Este enfoque es altamente específico pero adecuado solamente para cultivos puros (Raviv y Ley, 2013).

b. Serología:

Una prueba serológica positiva junto con la historia y los signos clínicos típicos de la enfermedad por *Mycoplasma sp.*, permiten dar un diagnóstico presuntivo en espera del aislamiento o identificación del organismo, que en el caso de MG y MS es mucho más lento (Raviv y Ley, 2013).

Es por esto, que las pruebas de serología siguen siendo la base de los programas de vigilancia de la micoplasmosis en los lotes de aves (Kempf, 1998; Raviv y Kleven, 2009;

Raviv y Ley, 2013). Son muy útiles para ayudar en el diagnóstico cuando se sospecha de la infección, pero requieren de un cierto tiempo de seroconversión después de la infección de las aves (Raviv y Kleven, 2009; Raviv y Ley, 2013). En el caso de la aglutinación sérica en placa (SPA) se requiere un mínimo de una semana y en el caso de la IHA sobre tres semanas para poder detectar los anticuerpos (García *et al.*, 2005; Raviv y Kleven, 2009). El uso de ciertos antimicrobianos, especialmente temprano durante el curso de la infección, puede afectar el desarrollo de la respuesta detectable por anticuerpos (Raviv y Ley, 2013).

La SPA es una prueba rápida, relativamente económica, sensible y ha sido ampliamente usada como serodiagnóstico y como prueba inicial de *screening* para el monitoreo de los lotes de aves. Además, los antígenos de MS y MG para la detección de anticuerpos mediante la prueba de SPA, pueden ser adquiridos a nivel comercial. No obstante, la SPA puede carecer de sensibilidad, se han descrito reacciones no específicas en lotes de aves infectados con MG o con MS, produciéndose reacciones cruzadas, especialmente en lotes de aves recientemente vacunados (Raviv y Ley, 2013; Ferguson-Noel y Noormohammadi, 2013). También se ha descrito que el antígeno de MG ocasionalmente puede auto aglutinar. Por todo esto, para confirmar la especificidad de la reacción se utiliza la prueba de IHA (Ferguson-Noel y Noormohammadi, 2013).

La prueba de ELISA fue desarrollada para incrementar la eficiencia de las pruebas serológicas y mejorar la especificidad y sensibilidad de los resultados relativos a las pruebas de SPA e IHA (Raviv y Ley, 2013). Es utilizada como prueba diagnóstica de rutina para monitorear a los lotes de aves y puede incluso reemplazar a la prueba de SPA como prueba serológica primaria. Además se encuentran comercialmente disponibles los *kits* de ELISA para MG, MS y MM (Ferguson-Noel y Noormohammadi, 2013).

En laboratorios de diagnóstico de los Estados Unidos (y también de Chile), el ELISA es la prueba serológica de elección para monitorear lotes de aves comerciales que puedan estar infectados con MG y MS. Puede ser utilizada para detectar anticuerpos locales en muestras

de lavados lagrimales, lavados de tracto respiratorio y en muestras de saco vitelino, pero es a partir de muestras de suero de aves en donde es comúnmente utilizada la prueba (Raviv y Ley, 2013).

Una característica útil de MG, MS y MM es la hemoaglutinación de los eritrocitos de pollo y de pavo. Los antígenos hemaglutinantes son utilizados en la prueba serológica de la IHA para estas tres especies patógenas (Ferguson- Noel, 2013). La prueba de IHA ha sido comúnmente usada para confirmar reacciones detectadas por SPA o, más recientemente ELISA, debido a su alto grado de especificidad. Sin embargo, la prueba de IHA puede consumir mucho tiempo y los reactivos se encuentran disponibles solo en laboratorios especializados (Raviv y Ley, 2013).

c. Técnicas moleculares:

En la mayoría de los países, inclusive en Chile, los programas de control de micoplasmosis aviar se cimientan sobre el mantenimiento de abuelas y reproductoras libres de la infección de MG y MS, para generar una progenie libre de micoplasmas adquiridos mediante la vía transovárica (Levisohn y Kleven, 2000). Esto implica fomentar y mantener un programa permanente de vigilancia de MG y MS mediante pruebas de monitoreo, como son las ya mencionadas pruebas serológicas. Al mismo tiempo, disponer de una técnica de reconocimiento molecular de MG y MS, como herramienta confirmatoria de la infección o de la ausencia de estos, que brinde resultados en poco tiempo.

La Reacción de la polimerasa en cadena (PCR), fue creada originalmente en el año 1971 (Kleppe *et al.*, 1971). Pero fue solo en el año 1990, en que Kary Mullis logró perfeccionar la técnica de PCR haciéndola más eficiente y versátil (Mullis, 1990). Esta tuvo tanto impacto en el mundo científico, que en el año 1993 se le concedió el Premio Nobel de Química.

La PCR es un ensayo molecular que permite la amplificación de un fragmento de DNA específico. Requiere de la presencia de un molde de DNA, los partidores, que corresponden a fragmentos cortos de DNA con una secuencia definida complementaria al DNA blanco, que sirven como punto de extensión para la DNA polimerasa, los nucleótidos adenina, timina, citosina y guanina, $MgCl_2$ como cofactor de la reacción y la enzima DNA polimerasa, que es la encargada de enlazar los nucleótidos para formar el producto de PCR. Todos estos compuestos se incorporan en tubos y se llevan a un termociclador, que realiza los ciclos repetidos de amplificación de DNA, en tres pasos básicos: Primero, la desnaturalización, donde la solución de reacción se calienta por sobre el punto de fusión del DNA, lo que permite que las hebras complementarias se separen. A continuación, la temperatura disminuye para permitir que los partidores específicos se unan a los segmentos de DNA blanco, este proceso se llama hibridación. Finalmente el siguiente paso, la extensión, donde la temperatura se eleva y la enzima DNA polimerasa extiende los partidores mediante la adición de nucleótidos a la cadena de DNA en desarrollo. Con cada repetición de estos tres pasos, el número de copias de DNA se va duplicando (Bej *et al.*, 1991; Garibyan y Avashia, 2013).

La PCR es una prueba simple, rápida y muy sensible para la detección del DNA de MS y de MG obtenidos desde tejidos de tracto respiratorio alto, medios de cultivo, o desde otro tipo de muestras y puede ser usada como prueba confirmatoria de resultados serológicos (Levisohn y Kleven, 2000; Ferguson-Noel y Noormohammadi, 2013). Hoy en día, económicamente hablando, los costos de la PCR se han ido reduciendo y la relación costo beneficio se ha hecho bastante atractiva para implementarla como prueba confirmatoria o de rutina en los laboratorios de diagnóstico (Buim *et al.*, 2009).

Los resultados de la prueba de PCR pueden ser obtenidos en un día, o incluso en horas, lo que se contrapone totalmente a lo laborioso o lento que puede llegar a ser el cultivo y aislamiento bacteriano, que puede tomar de una a tres semanas (Levisohn y Kleven, 2000; García *et al.*, 2005; Raviv y Ley, 2013).

Además, la PCR posee un alto nivel de sensibilidad frente a la detección de organismos provenientes de muestras clínicas tomadas desde animales asintomáticos, o de animales sometidos a terapia antibiótica, situación en que se asume un escaso número de bacterias presentes. También, la PCR puede detectar el patógeno anticipándose a la respuesta inmune, o en un hospedero con depresión inmunológica, esto porque en ambos casos se requiere la formación de anticuerpos para ser detectados mediante pruebas serológicas, por lo tanto, las pruebas serológicas pueden utilizarse a lo menos una o dos semanas posteriores a la infección (Buim *et al.*, 2009; Ewing *et al.*, 1996).

A diferencia del cultivo y aislamiento bacteriano, que solo es capaz de reconocer organismos viables o estructuralmente completos, la PCR es capaz de brindar resultados positivos a partir de células incompletas o deterioradas, puesto que solo necesita de la integridad del DNA para que éste pueda ser amplificado (Kempf, 1998; García *et al.*, 2005; Raviv y Ley, 2013). Esto hace a la PCR una técnica menos sensible a los factores ambientales que dañan las células, a la influencia de un inadecuado transporte o almacenamiento de la muestras, o frente al uso de terapia antibiótica.

Hoy en día, también existen muchos estudios que respaldan el uso de protocolos internos de PCR para MG y MS, o de otras técnicas moleculares basadas en PCR, con distintos fines, como por ejemplo: establecer relaciones filogenéticas entre distintos aislados, realizar análisis epidemiológicos, o el simple diagnóstico de la infección.

En el estudio que hemos llevado a cabo, desarrollamos la prueba de PCR para amplificar un fragmento del gen que codifica el RNA ribosomal 16S (RNAr 16S) para identificar molecularmente la presencia de MG y MS en exudado traqueal de gallinas de postura.

Los ribosomas bacterianos son organelos complejos especializados en el proceso de síntesis de proteínas. Están formados por dos subunidades: la subunidad grande 50S que

contiene los RNAr 5S y 23S junto con 34 proteínas ribosómicas y la subunidad pequeña 30S que contiene el RNAr 16S y 21 proteínas ribosómicas (Rodicio y Mendoza, 2004).

El RNAr 16S es un polirribonucleótido de aproximadamente 1500 nucleótidos de extensión, codificado por el gen *rrs*, también denominado DNA ribosomal 16S (DNAr 16S) (Rodicio y Mendoza, 2004). El RNAr 16S se puede utilizar como herramienta filogenética y taxonómica ya que es una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales, de estructura altamente conservada, que ha permanecido constante durante un tiempo muy prolongado. Además contiene variaciones que se concentran en zonas específicas, suficientes para diferenciar no sólo los organismos más alejados, sino también los más próximos (Rodicio y Mendoza, 2004; Amit-Romach *et al.*, 2004; Chakravorty *et al.*, 2007).

Los genes bacterianos que codifican los RNAr 16S generalmente contienen nueve "regiones hipervariables" que demuestran un grado de diversidad considerable en su secuencia entre las diferentes especies bacterianas, las que pueden ser utilizadas para la identificación de especies. Las regiones hipervariables están flanqueadas por tramos conservados en la mayoría de las bacterias, lo que permite la amplificación por PCR de secuencias blanco utilizando partidores universales. Numerosos estudios han logrado identificar secuencias de regiones hipervariables del gen que codifica el RNAr 16S, identificando una única especie bacteriana o un número limitado de diferentes especies o géneros (Chakravorty *et al.*, 2007).

Los avances en técnicas moleculares basadas en RNAr 16S, o de los genes que lo codifican, han hecho posible la identificación de diferentes poblaciones bacterianas, prescindiendo de la técnica de cultivo y aislamiento, especialmente cuando se trata de bacterias fastidiosas con requerimientos nutricionales complejos, o de bacterias de crecimiento lento, que retrasan considerablemente la identificación mediante cultivo y aislamiento bacteriano (Rodicio y Mendoza, 2004; Amit-Romach *et al.*, 2004), como es el caso de los micoplasmas aviares.

Son varios los estudios que han empleado la prueba de la PCR basada en un fragmento del gen RNAr 16S para identificar MG y MS en poblaciones de aves comerciales, o en condiciones de laboratorio.

Lauerman y colaboradores, desarrollaron un ensayo de PCR que amplifica un fragmento del gen RNAr 16S de MS y lo evaluaron como prueba de diagnóstico. Inicialmente, este estudio fue concebido para proponer una herramienta de diagnóstico alternativa a la que se utiliza actualmente como confirmación de la infección - el cultivo y aislamiento bacteriano, que presenta ciertos desafíos de tipo prácticos, ya mencionados anteriormente-. En su estudio utilizaron 55 cepas estándar de MS, como controles negativos de la reacción utilizaron el DNA de 44 cepas distintas pertenecientes a ocho especies de micoplasmas. Dentro de estas, 18 cepas de MG, siete cepas de *M. iowae* y tres cepas de *M. meleagridis*. También trabajaron en la identificación del DNA extraído de muestras proveniente de tres grupos de pollos inoculados experimentalmente con cepas de MS, con *M. gallinarum* y un grupo control. Paralelamente, trabajaron con un número no especificado de muestras de campo que representaban a 122 lotes de aves, entre ellas, pollos broilers, gallinas de postura y aves no comerciales. En todos los casos se pudo identificar exitosamente el DNA de MS mediante la prueba de PCR, obteniendo los siguientes resultados: 55 cepas de estándar de MS positivas al MS-PCR, 44 cepas estándar de micoplasmas (no MS) negativas al MS-PCR. El grupo inoculado con MS fue positivo a MS-PCR, mientras que los grupos inoculados con *M. gallinarum* y grupo control fueron negativos al MS-PCR. Dentro de los 122 lotes de campo representados, 54 resultaron ser positivos a MS. En conclusión, solo el DNA de MS pudo ser identificado por la prueba de PCR para MS, mientras que el DNA de otras especies de micoplasmas, no pudo ser identificado, descartándose la posibilidad de reacciones cruzadas con las especies de bacterias relacionadas filogenéticamente a MS (Lauerman *et al.*, 1993).

Posterior a este estudio, en el año 1998, Lauerman, publica un manual para el diagnóstico de enfermedades de animales, mediante la amplificación de sus ácidos nucleicos.

Dedicando un capítulo a la descripción de protocolos de PCR y partidores específicos para distintas especies de micoplasmas aviáres, entre ellos, MG y MS. Es a partir de estas dos publicaciones de Lauerman, de donde se toman las directrices para realizar el estudio expuesto en esta memoria de título.

Hong y colaboradores, compararon los resultados obtenidos mediante la técnica de PCR para MS. Utilizando dos protocolos distintos, uno para la amplificación de un fragmento del gen RNAr 16S y otro para la amplificación de un fragmento del gen *vlhA*. Ambos protocolos descritos serían capaces de amplificar solamente aislados y cepas de MS, no existiendo reacciones cruzadas con otros micoplasmas aviáres. Sin embargo, según sus resultados, el protocolo para el gen RNAr 16S fue más sensible que el protocolo para el gen *vlhA*, siendo capaz de detectar mediante PCR, el DNA de MS, extraído de un cultivo de mayor dilución (Hong *et al.*, 2004).

Feberwee y colaboradores, realizaron un estudio que fue capaz de establecer por primera vez la relación entre la presencia de MS en oviducto de gallinas y la presencia de anomalías a nivel del ápice de la cascara de huevo. Con el uso de la técnica de PCR, que amplifica un fragmento del gen que codifica el RNAr 16S se pudo corroborar la presencia de MS a nivel del tejido oviductal de gallinas serológicamente positivas (Feberwee *et al.*, 2009).

Muchos otros trabajos han puesto en práctica los protocolos de amplificación de un fragmento del gen que codifica el RNA ribosomal 16S tanto para MG (Moscoso *et al.*, 2004; Hanif y Najeeb, 2007; Islam *et al.*, 2011; Rauf *et al.*, 2013) como para MS (Silveira *et al.*, 1996; Marois *et al.*, 2000; Moscoso *et al.*, 2004; Buim *et al.*, 2009; Pourbakhsh *et al.*, 2010; Ehtisham-ul-Haque *et al.*, 2010). Así como de protocolos de amplificación basados en otros genes diana descritos (Salisch *et al.*, 1999; Hong *et al.*, 2004; García *et al.*, 2005).

Asimismo, se han desarrollado protocolos de PCR capaces de identificar dos o más agentes de una sola vez, la técnica es conocida como *Multiplex-PCR*. Buim y colaboradores desarrollaron un protocolo para la detección conjunta del DNA de MG, de MS y de la cepa vacunal F de MG (Buim *et al.*, 2009). De igual forma, se ha descrito el uso de un protocolo capaz de identificar simultáneamente los cuatro micoplasmas aviares más importantes, MG, MS, MM y MI (Wang *et al.*, 1997). También fue desarrollado un protocolo para la identificación de seis patógenos respiratorios de importancia en la avicultura, estos son el virus de la bronquitis infecciosa, el virus de la laringotraqueítis infecciosa, el virus de la influenza aviar, el virus de la enfermedad de Newcastle y las bacterias MG y MS (Pang *et al.*, 2002).

Se han desarrollado protocolos de PCR en tiempo real (q-PCR) para identificar lotes de aves afectados por micoplasmosis aviar y dar seguimiento a la síntesis de nuevos productos en la PCR mediante la visualización con tinciones o fluorocromos. Se desarrolló un protocolo de q-PCR para identificar el DNA de MG presente en exudado traqueal de pollos, utilizando la tinción SYBR Green I (Carli y Eyigor, 2003). Otro ensayo para detectar simultáneamente MG y MS en una misma reacción, utilizando también SYBR Green (Jarquin *et al.*, 2009). Del mismo modo, un protocolo para identificar los cuatro micoplasmas aviares, MG, MS, MM y MI (Raviv y Kleven, 2009). Sin duda, estos estudios demuestran que la tecnología de q-PCR es muy específica, sensible, rápida y eficiente, pero hasta el día de hoy no ha logrado desplazar por completo a la PCR convencional. Esto debido al mayor costo monetario de los equipos e insumos utilizados en q-PCR. Además, porque la PCR convencional es por ahora imprescindible en las técnicas de secuenciación genética, no así el q-PCR, por lo que su uso por ahora es más acotado al área científica y de investigación.

De igual forma, se han empleado otras pruebas de tipo molecular basadas en la PCR, que pueden ser de utilidad para diferenciar cepas dentro de una misma especie, para establecer relaciones filogenéticas, realizar análisis epidemiológicos, etc. Estas pruebas cuentan con

grados variables de especificidad y sensibilidad, brindan resultados rápidamente y en algunos casos son de desarrollo relativamente sencillo. Sin embargo, por ahora son más bien técnicas utilizadas por laboratorios especializados, o dentro del ámbito de la investigación y algunas de ellas pueden carecer de reproducibilidad (Levisohn y Kleven, 2000).

La técnica de polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) fue usada para diferenciar las cepas vacunales F y ts-11 de MG, utilizando enzimas de restricción, en muestras provenientes de reproductoras y de ponedoras comerciales (Carrión *et al.*, 2012). Un par de estudios realizados por Charlton y colaboradores, utilizaron la técnica de amplificación aleatoria del DNA polimórfico (RAPD-PCR), para evidenciar las diferencias o similitudes entre cepas de referencia, cepas vacunales y entre aislados de campo pertenecientes a distintas compañías, mediante el desarrollo de patrones de bandas generados a través de un PCR que utiliza partidores de secuencia aleatoria (Charlton *et al.*, 1999; Charlton *et al.*, 1999b). También se describe en un estudio realizado en Brasil, la utilización del RAPD-PCR, en conjunto con otra técnica llamada electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) para analizar la relación genética que existe entre cepas de referencia, cepas vacunales y aislados de campo de MG (Mettifogo *et al.*, 2006).

A pesar de que estas técnicas pueden ser muy útiles para analizar relaciones epidemiológicas, e identificar de forma rápida la variabilidad genética de los aislados, pueden tener desventajas, como son la falta de reproducibilidad, la necesidad de contar con cultivos puros, o la difícil interpretación de los resultados, como es el caso de RAPD (Mettifogo *et al.*, 2006; Kleven y Bradbury, 2008) o técnicas muy laboriosas que requieren mucho tiempo como es el caso de PFGE (Mettifogo *et al.*, 2006).

Asimismo, se han descrito técnicas de hibridación con sondas específicas de DNA, para detectar MG o MS, en muestras provenientes de pollo y también de pavos, e incluso en

muestras tomadas desde gansos y patos de traspatio (Fernández *et al.*, 1993; Kleven y Bradbury, 2008; Sprygin *et al.*, 2010).

Diferentes estudios, han logrado secuenciar genéticamente parte del DNA de MG o de MS. Moalic y colaboradores lograron identificar la presencia de *Mycoplasma pullorum* en pavos, una especie que hasta el momento no ha sido reconocida como patógenas para aves comerciales (Moalic *et al.*, 1997). Por su parte, Hong y colaboradores, utilizaron la secuenciación genética del gen *vlhA* para tipificar cepas de referencia de MS, aislados de MS de ponedoras comerciales y muestras clínicas extraídas desde filtros de papel FTA® (Hong *et al.*, 2004).

A pesar de las ventajas que brindan las pruebas moleculares, Kempf (1998), advierte que estas no deben reemplazar totalmente a las pruebas serológicas, que han sido el método convencional de diagnóstico. Especialmente en el caso del diagnóstico de la infección por MG o MS en pollitos de un día de edad. El diagnóstico debería basarse en métodos serológicos, ya que los anticuerpos maternos se pueden encontrar en la mayoría de los pollitos provenientes de lotes de gallinas infectadas con MG o MS, y también debido al bajo porcentaje de pollitos realmente infectados que puedan alojar a los micoplasmas en su sistema respiratorio (Kempf, 1998).

Otros estudios apoyan la premisa de utilizar más de una herramienta diagnóstica para evaluar y confirmar la infección de MG y MS en lotes de aves de producción. Ewing y colaboradores, proponen utilizar las pruebas serológicas, principalmente la técnica de ELISA como prueba de *screening* en los lotes de aves, mientras que la técnica de PCR sería adecuada como prueba confirmatoria de los resultados anteriormente obtenidos. Incluso cuenta con ventajas por sobre el cultivo y aislamiento bacteriano, ya que la PCR brinda resultados en mucho menor tiempo, también por sobre las técnicas serológicas, ya que se ha visto que bajo algunas situaciones, las aves pueden presentar una respuesta inmune retardada, en las que se ha demostrado mediante la prueba de PCR, estar infectadas con MS

(Ewing *et al.*, 1996; Ewing *et al.*, 1998). Por su parte, otros autores proponen directamente utilizar la aglutinación sérica rápida (RSA) como *screening* y la PCR como prueba confirmatoria de los resultados obtenidos (Ehtisham-ul-Haque *et al.*, 2010). Mientras que Feberwee y colaboradores, después de realizar un estudio que comparó las técnicas de cultivo y aislamiento bacteriano, PCR y las pruebas serológicas de SPA, IHA y ELISA, para diagnosticar la infección por MG y MS, llegaron a la conclusión de que no es aconsejable confiar completamente en un solo sistema de prueba, sino más bien, se aconseja complementarlos, que cada prueba seleccionada a utilizar debe evaluarse en condiciones de campo y en directa relación con los objetivos: detección de infección general (*screening*), detección temprana (lotes de reproductoras) o detección de infecciones crónicas (aves de postura) (Feberwee *et al.*, 2005).

Diagnóstico diferencial

La infección por MG en aves puede ser diferenciada de otras enfermedades respiratorias, pero generalmente produce evidencia clínica solo cuando se presenta en conjunto con infecciones respiratorias como la enfermedad de Newcastle (NDV), bronquitis infecciosa (IBV) o *Escherichia coli*. Cuando se presentan en conjunto, se les conoce como Síndrome Respiratorio Crónico (CRD). Otras enfermedades, como el coriza infeccioso (*Avibacterium paragallinarum*) y el cólera de los pollos (*Pasteurella multocida*) también pueden confundirse con una infección de MG, pero estos pueden ser identificados y diferenciados mediante cultivo y aislamiento bacteriano (Raviv y Ley, 2013).

MG es capaz de causar bursitis esternal y lesiones en articulaciones, por lo que se puede confundir con infección por MS. Del mismo modo, MS es capaz de comprometer el sistema respiratorio, por lo que también tiende a confundirse con una infección por MG u otros agentes que presentan signología respiratoria (Ferguson-Noel y Noormohammadi, 2013). Las infecciones por MS y MG puede estar actuando solas o en conjunto. Para

diferenciarlas, es útil la aplicación de pruebas serológicas y de identificación del agente (Raviv y Ley, 2013).

Una especie menos conocida de micoplasma: *Mycoplasma imitans*, puede producir reacciones serológicas cruzadas con MG (Bradbury *et al.*, 1993), esto debido a que ambos poseen una estrecha relación filogenética. Sin embargo, pueden ser diferenciados usando técnicas moleculares (Harasawa *et al.*, 2004; Bradbury *et al.*, 1993; Kempf, 1998; García *et al.*, 2005). Además, *M. imitans*, por ahora no ha sido reportado en aves de corral (Salisch *et al.*, 1998; García *et al.*, 2005). Ha sido aislado solamente de gansos, patos, perdices y aves acuáticas (Harasawa *et al.*, 2004; Bradbury *et al.*, 1993; Kempf, 1998; García *et al.*, 2005).

El diagnóstico presuntivo de MS, puede ser hecho en base al diagnóstico clínico, cuando se presenta debilidad de patas, bursitis esternal, aumento de volumen de almohadillas plantares o de articulación tarso metatarsiana. Bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, pasteurellas y salmonelas, pueden ser causa primaria de sinovitis o artritis. Estas pueden ser diferenciadas de MS mediante procedimientos bacteriológicos. (Ferguson-Noel y Noormohammadi, 2013).

El diagnóstico diferencial para agentes causantes de sintomatología a nivel articular, como es el caso de reovirus, que produce la artritis viral, puede ser diferenciado de MS por diagnóstico clínico si se presentan lesiones tales como la fibrosis de los tendones extensor metatarsal o del flexor digital, e infiltración linfocítica del miocardio. Además, el suero de pollos infectados con tendosinovitis viral no aglutina el antígeno de MS, pero hay que tener en cuenta que ambos agentes podrían estar actuando en conjunto, por lo que la reacción de aglutinación evidencia la presencia de MS, pero no descarta la presencia de reovirus (Ferguson-Noel y Noormohammadi, 2013).

Estrategias de Control

El control de la infección producida por MG y MS en aves de corral puede ser obtenido a través de distintas estrategias, estas son: a) la erradicación de la infección, b) mediante los programas preventivos de vacunación, o c) el tratamiento de la enfermedad (Charlton *et al.*, 1999).

a. Erradicación de la infección.

Debido a que MG y MS pueden ser transmitidos al huevo, la mantención de lotes comerciales libres de infección sólo es posible a partir de poblaciones reproductoras libres de MG y de MS y a continuación, criarlos con un nivel de bioseguridad adecuado para evitar la introducción de estos, u otros microorganismos (Raviv y Ley, 2013; Ferguson-Noel y Noormohammadi, 2013).

Para mantener la condición de libertad de infección, se puede optar por la participación en los programas de control de micoplasmosis aviar existentes en distintos países. Siendo el primero, el plan de mejoramiento avícola creado en Estados Unidos de América (USA). Posteriormente vendrían otros, como es el caso del existente en Chile, que se hace efectivo en el año 2009.

El Plan Nacional de Mejoramiento Avícola (NPIP) de USA, se estableció en 1935 en respuesta a una solicitud hecha por la industria avícola, para estandarizar los requisitos para la cría, transporte y control de enfermedades de las aves de corral en USA. El plan está compuesto por programas diseñados para prevenir y controlar la diseminación de enfermedades de las aves y la transmisión a los huevos. La fuerza impulsora detrás de esta

petición fue una serie de eventos que comienza con el descubrimiento de *Salmonella pullorum* y posteriormente de *Salmonella gallinarum* (Holzbauer, 2004).

Con el escenario existente en esos años en Estados Unidos, de una gran demanda por desarrollar pollos libres de *Salmonella pullorum* y *Salmonella gallinarum*. Algunos Estados, comenzaron individualmente a formular sus propios programas de pruebas para identificar poblaciones libres de enfermedades. Pronto se hizo evidente que era necesario un programa a nivel nacional para definir criterios y terminologías, por lo que en el año 1935 nace el NPIP (Holzbauer, 2004).

Posteriormente, en el año 1943 se crea el Programa Nacional de Mejoramiento de Pavos (NTIP), tras el hallazgo de *Mycoplasma gallisepticum* como causa de la Enfermedad Respiratoria Crónica en pollos y la plueropneumonia-like (PPLO) en los pavos, que produjeron grandes pérdidas económicas por decomiso de carnes que presentaban aerosaculitis. Además se da a conocer la capacidad de MG de ser transmitido por vía ovárica. Es por esto que en el año 1965 MG es integrado al NTIP y en el año 1966 es integrado al NPIP (Anón., 1984).

Posteriormente, en el año 1970, el NPIP y el NTIP fueron combinados en un solo programa, conservando el nombre de “Plan Nacional de Mejoramiento Avícola”. En el año 1974, cuando se descubre que *Mycoplasma synoviae* es el agente etiológico de la sinovitis infecciosa en pollos y de los pavos y que también puede ser transmitido al huevo, es añadido como parte del Plan. A continuación, en 1983, *Mycoplasma meleagridis* se añade al NPIP como una enfermedad de control en lotes de pavos reproductores (Anón., 1984).

El NPIP es un programa de cooperación Estado-Federal-Industrial. En cada estado, el plan es administrado por un organismo oficial del Estado, en cooperación con el Departamento

de Agricultura de los Estados Unidos (USDA). En la actualidad, el NPIP tiene programas de control de *Salmonella pullorum*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella enteritidis*, MG, MS y MM (Holzbauer, 2004).

Algunos de los progresos logrados con este plan, expuestos en su libro publicado en el aniversario número 50 del plan de mejoramiento avícola, señalan que frente al control de MG en lotes de pavos reproductores, desde el año 1966, en que se integra MG como parte del plan, de un total de 1649 lotes testeados, 8,7% de los lotes fueron positivos (143 lotes), mientras que en el año 1980, esta cifra disminuye a un 0,15% (un lote positivo de un total de 652). En reproductores broilers, en el año 1970, de un total de 1070 lotes muestreados, el 5,1% fueron positivos a MG (55 lotes), versus solo un 0,23% de positivos en el año 1980 (tres lotes de 1310). En cuanto al decomiso de pollos por aerosaculitis, los valores habrían disminuido considerablemente desde la puesta en marcha del plan y más aun con la introducción de MG y MS (Anón., 1984).

En el año 2004, el SAG, en conjunto con la Asociación de Productores Avícolas de Chile (APA), formó una alianza estratégica para formar el “Proyecto Nacional de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades de aves”, el objetivo de este programa fue implementar un sistema de vigilancia epidemiológica de enfermedades exóticas (Influenza aviar y Enfermedad de Newcastle) y evaluar la situación sanitaria nacional de la Bronquitis infecciosa nefropatogénica, entre otras cosas. Entrando en vigencia en marzo del 2004, con una duración de cuatro años (Servicio Agrícola y Ganadero, 2005).

En el año 2008, el proyecto fue modificado, con el fin de incorporar la vigilancia de *Salmonella gallinarum*, *S. pullorum*, salmonelas paratíficas, *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae* y *M. meleagridis* en plantales destinados a la producción de carne como respaldo a la certificación sanitaria de exportación. Junto a lo anterior, el proyecto incluye la

acreditación de laboratorios universitarios y privados para el diagnóstico de *Salmonella* y *Mycoplasma* (Servicio Agrícola y Ganadero 2008; Servicio Agrícola y Ganadero 2009b).

Es así que durante el año 2009, entra en vigencia el Programa Oficial de Control de *Mycoplasma sp.* que forma parte del Programa de Vigilancia Epidemiológica, a cargo de la División de Protección Pecuaria del SAG. Este puede ser aplicado de forma voluntaria en los distintos estratos de aves comerciales, pero es aplicado de forma obligatoria en plantales PABCO, poniendo énfasis en estratos de abuelas broilers y reproductoras broiler y pavos (Servicio Agrícola y Ganadero, 2009a).

Las cifras entregadas por los informes de sanidad animal publicados por el SAG anualmente, revelan que MS sigue siendo el micoplasma predominante en Chile y que MG y MM están ausentes a nivel de los estratos de abuelas y reproductoras broilers así como en reproductoras de pavos comerciales (Servicio Agrícola y Ganadero, 2014a).

Algunas de las medidas a tomar frente a la confirmación de lotes de abuelas y reproductoras positivas a MG, que establece el Programa Oficial de Control de *Mycoplasma sp.* son las siguientes: a) Exclusión del lote para efectos de certificación de la exportación de huevos fértiles y aves de un día para la comercialización. b) Las aves de un día, provenientes de lotes de abuelas o reproductoras que hayan sido despachadas a otras unidades, deberán ser chequeadas serológicamente para asegurar que no hubo transmisión vertical. c) Establecimiento de una cuarentena predial permitiendo la salida, solamente de huevos fértiles con destino a plantas de incubación de la empresa afectada y se recomendará la eliminación del lote de aves. La salida de aves sólo tendrá por destino una planta faenadora o una planta de *rendering*.

Debido a que la densidad de la población de aves de corral han aumentado en los últimos años, se vuelve un factor de riesgo para la bioseguridad de los planteles, por lo que la mantención de las aves de corral como libres de MG y MS puede ser difícil. Es por esto que, una apropiada terapia antimicrobiana puede ser utilizada para reducir la morbilidad, mortalidad y las pérdidas en producción (Raviv y Ley, 2013; Ferguson-Noel y Noormohammadi, 2013). La vacunación puede ser una opción en algunas situaciones, sin embargo, en Chile, la vacunación contra la micoplasmosis aviar no está autorizada.

b. Vacunación:

En países en que la vacunación está autorizada, existen distintas vacunas comerciales disponibles en el mercado. Es el caso de la cepa vacunal F, la cepa 6/85 y la cepa ts-11 que protegen contra MG (Levisohn y Kleven, 2000).

La cepa vacunal F, es una cepa relativamente suave, se utiliza en complejos de múltiples edades para reducir las pérdidas de producción de huevos causado por MG. Mientras que en pollos broiler, es capaz de brindar cierta protección contra la aerosaculitis. La cepa F puede ser transmitida a través de los huevos y de ave a ave (Raviv y Ley, 2013).

La cepa 6/85 posee poco o nada de transmisibilidad horizontal. En los Estados Unidos, se ha utilizado principalmente para la prevención de pérdidas en la producción de huevos en gallinas comerciales (Raviv y Ley, 2013).

La cepa vacunal ts-11 tiene un mínimo o ninguna virulencia para pollos y pavos y se puede transmitir de un ave a otra. También ha sido utilizada principalmente para la prevención de pérdidas en la producción de huevos (Raviv y Ley, 2013).

En cuanto a MS, existe una bacterina inactivada en emulsión de aceite, disponible a nivel comercial. También se ha utilizado una cepa vacunal viva sensible a la temperatura, MS-H, que ha logrado demostrar ser eficaz en la reducción de las anomalías apicales de la cáscara de huevo causada por la infección de MS. Ha sido utilizada en Australia y en otros países, pero no cuenta con licencia en Estados Unidos ni en Chile (Ferguson-Noel y Noormohammadi, 2013).

c. Tratamiento:

MG y MS han demostrado sensibilidad *in vitro* e *in vivo* a varios antimicrobianos, incluyendo macrólidos, tetraciclinas y fluoroquinolonas (tilosina, tiamulina, lincomicina, tetraciclina, oxitetraciclina, danofloxacina, enrofloxacina) pero es inherentemente resistente a las penicilinas u otros antibióticos que actúan mediante la inhibición de la biosíntesis de la pared celular (Raviv y Ley, 2013; Ferguson-Noel y Noormohammadi, 2013).

Los antimicrobianos se han utilizado para el tratamiento de enfermedades respiratorias y para reducir las pérdidas de producción de huevos y la transmisión hacia los embriones. Pueden reducir la gravedad de los signos clínicos y las lesiones producidas por MG y por MS y han demostrado ser útiles para la prevención de aerosaculitis o sinovitis, producida por MS, pero el tratamiento de lesiones existentes es menos eficaz. Es capaz de reducir significativamente las poblaciones de MG y MS en el tracto respiratorio, pero no son capaces de eliminar la infección del lote (Raviv y Ley, 2013; Ferguson-Noel y Noormohammadi, 2013). Del mismo modo, un estudio realizado en Holanda, demostró que el uso de oxitetraciclina en gallinas infectadas con MS, produjo una disminución momentánea en la postura de huevos con anomalías de cáscara, sin embargo, la presencia de MS persistió a nivel de oviducto (Feberwee *et al.*, 2009).

III. OBJETIVO GENERAL

Implementar un protocolo de Reacción de la Polimerasa en Cadena como herramienta diagnóstica de la micoplasmosis aviar en Chile.

IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Demostrar la capacidad de un protocolo de PCR, en el reconocimiento molecular de cepas de referencia de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae*.
2. Identificar el DNA de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae*, en muestras de campo de gallinas ponedoras, provenientes de un plantel serológicamente positivo a *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales:

1.1 Muestras de referencia y muestras de campo de MG y MS:

- 1.1.1 Cepas estándar como referencia para la identificación molecular del DNA de MG y MS:

Se empleó la cepas A5969 de *Mycoplasma gallisepticum* y la cepa WVU1853 de *Mycoplasma synoviae*, elaborados para fines diagnósticos por el Laboratorio

Nacional de Servicios Veterinarios (NVSL) del Servicio de Inspección de Sanidad Agropecuaria (APHIS), del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), debidamente autorizados por el SAG, del Ministerio de Agricultura de Chile.

1.1.2 Muestras de campo para detección molecular del DNA de MG y MS:

Se tomaron tómulas con exudado traqueal obtenidas desde gallinas de postura, pertenecientes al sector Los Espinos, que forma parte de una granja de producción de huevos de consumo, compuesta por 8 sectores y que alojaba alrededor de 110.000 gallinas en producción, establecida en la comuna de Quilpué, Chile.

En un estudio anterior, la granja demostró porcentajes variables de seropositividad a MG y a MS, mediante la prueba de ELISA, en los distintos sectores que la componen (Castillo, 2015).

1.2 Equipamiento:

- Termociclador “MaxiGene II”, Axygen Biosciences
- Centrifuga para microtubos “Heraeus Megafuge 16R”, Thermo Scientific
- Vórtex “SuperMixer Cat. N°1291”, Lab-line Instruments
- Gabinete de bioseguridad Clase II-A2 con luz UV, LabTech
- Baño de agua termoregulado, MRC Scientific Instruments
- Espectrofotómetro con luz UV, Biowave DNA
- Cámaras de electroforesis “Gel Box Midiplus”, Select Bioproducts
- Fuente de poder “BioVolt 300V”, Select Bioproducts
- Transiluminador UV “MD-20 312 nm”, Wealtec

1.3 Reactivos y fungibles:

- Kit de extracción y purificación de DNA “NucleoSpin® Tissue”, Macherey-Nagel
- H₂O libre de nucleasas grado biología molecular, HyClone Thermo Scientific
- 10X Tampón para PCR, RBC Biosciences
- Desoxiribonucleotidos trifosfato (dNTP's) 10 Mm, RBC Biosciences
- Partidor *Forward* para MG o para MS 2 μmoles/μl, Integrated DNA Technologies
- Partidor *Rerverse* para MG o para MS 2 μmoles/μl, Integrated DNA Technologies
- Taq DNA polimerasa 5 U/μl, RBC Biosciences
- Agarosa LE en polvo, grado biología molecular, Axygen Biosciences
- Buffer TAE 1X.
- “Gel Red” para tinción de ácidos nucleicos 10000X en DMSO, Biotium
- Marcador de pares de bases “GeneRuler 100 bp DNA ladder” 0,5μg/μl, Fermentas
- Buffer de corrida “DNA 6X loading dye”, Fermentas
- Micropipetas 0,1-2,5 μl, 2-20 μl, 5-50 μl, 100-1000 μl, 1000-5000 μl, AccumaxPro
- Tómulas de algodón estériles
- Buffer fosfato salino (PBS)
- Tubos plásticos de transporte de muestras “Vacuum tube”, BD Vacutainer.
- Microtubos libres de DNAsa/RNAsa 200 μl y 1,5 ml, Biologix Research Company
- Guantes de látex desechables libres de polvo, Top Globe
- Puntas desechables para pipetas, libres de DNAsa, RNAsa y de pirógenos, de 0,5-10 μl, 1-200 μl y 50-1000 μl, Axygen Scientific

1.4 Partidores:

Las secuencias de los partidores para MG y para MS fueron previamente diseñados por Lauerman (1993; 1998) y corresponden a fragmentos específicos de la secuencia del gen RNAr 16S. Estos fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies IDT, a una concentración de 25 nmoles cada oligonucleótido. Las secuencias son las siguientes:

- Para *Mycoplasma gallisepticum*:

MG14F: 5'-GAG-CTA-ATC-TGT-AAA-GTT-GGT-C-3'

MG13R: 5'- GCT-TCC-TTG-CGG-TTA-GCA-AC-3'

- Para *Mycoplasma synoviae*:

MS-F: 5'-GAG-AAG-CAA-AAT-AGT-GAT-ATC-A-3'

MS-R: 5'-CAG-TCG-TCT-CCG-AAG-TTA-ACA-A-3'

2. Métodos:

2.1 Obtención de las muestras de campo.

Se recolectaron muestras de secreción traqueal, según lo especificado por Lauerman y colaboradores (1993), introduciendo una tórula de algodón en el extremo superior de la tráquea, rotándolas suavemente para extraer la mayor cantidad de material posible. Las muestras fueron obtenidas desde gallinas de postura vivas, provenientes de un lote de aves sanas. Sin embargo, cuando fue posible, se seleccionaron aves que presentaran algún signo clínico que sugiriera el curso de un cuadro de tipo respiratorio.

La muestra estaba constituida por un pool de cuatro tórulas, las que se introdujeron en tubos plásticos con tapa. Para su conservación se les agregó como medio de transporte un ml de Buffer Fosfato Salino (PBS) a cada tubo y fueron trasladadas al laboratorio en un contenedor con hielo. En total, se contó con un número de 50 muestras para ser analizadas mediante PCR para MG y para MS.

2.2 Procedimiento de laboratorio.

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Patología Aviaria, del Departamento de Patología Animal, de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, de la Universidad de Chile.

Las muestras de campo fueron recibidas en el laboratorio. En primera instancia, se mantuvieron las tómulas en el interior de los tubos durante 24 horas, inmersas en el medio de transporte PBS a una temperatura de 4°C. Transcurrido ese tiempo, fueron llevadas a un vórtex a máxima velocidad, durante 20 segundos. Luego, en el interior del gabinete de bioseguridad, las tómulas fueron descartadas y el fluido fue depositado en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml. El material se mantuvo congelado a una temperatura de -20°C hasta el momento de su uso.

Se realizó un paso de extracción y purificación del DNA genómico de las cepas de referencia de MG y de MS y del DNA presente en las muestras de campo, utilizando un *kit* disponible en el mercado. A continuación, se desarrolló la técnica de PCR para la identificación del DNA de MG y MS (Lauerman *et al.*, 1993; Lauerman, 1998; Kleven y Bradbury, 2008). Finalmente, se realizó la electroforesis en gel de agarosa para visualizar con luz ultravioleta los productos de PCR (Lauerman *et al.*, 1993).

2.2.1. Extracción y purificación de DNA de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae*.

La fase de extracción y purificación del DNA genómico de MG y MS se realizó utilizando el *kit* comercial “NucleoSpin® Tissue”, de Macherey-Nagel. El procedimiento se desarrolló según las recomendaciones del fabricante, detallado a continuación:

Para la lisis de las muestras: Se obtuvo una alícuota de 100 μ l de cada una de las muestras, las que se depositaron individualmente en tubos de microcentrífuga. A cada una de las muestras se les agregó 180 μ l de Buffer T1 y 25 μ l de solución de proteinasa K. Luego se agitaron cada uno de los tubos para mezclarlos y se incubaron en un baño termostático a 56°C durante 15 minutos. A continuación, se agitaron las muestras y se les agregó a cada una 200 μ l de Buffer B3, agitando vigorosamente cada uno de los tubos e incubándolos nuevamente en el baño termostático a 70°C durante 10 minutos.

Para la retención del DNA en las membranas: Se agregó 210 μ l de etanol 96% a cada muestra y se agitaron vigorosamente. Para cada una de las muestras se utilizó una columna NucleoSpin® Tissue con membrana de sílica dentro de un tubo de recolección y se incorporó cada muestra completamente dentro de la columna. Las muestras fueron centrifugadas durante un minuto a 11.000 xg, luego se descartó el contenido filtrado a través de la membrana junto con el tubo de recolección de cada una, poniendo las columnas en nuevos tubos de recolección.

Para el lavado del DNA retenido en las membranas: Para el primer lavado se añadió 500 μ l de Buffer BW a cada muestra, las que se centrifugaron durante un minuto a 11.000 xg, descartando el filtrado. Para el segundo lavado, se agregaron 600 μ l de Buffer B5 a las muestras y se centrifugaron durante un minuto a 11.000 xg, descartando nuevamente el filtrado. A continuación, se centrifugaron en seco durante 1 minuto a 11.000 xg.

Para la elución del DNA puro: Se depositaron cada una de las muestras contenidas en las columnas NucleoSpin® Tissue en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, se agregó a cada una de ellas 100 μ l de Buffer BE. Se incubaron a temperatura ambiente durante un minuto, luego se centrifugaron durante un minuto a 11.000 xg. De esta forma, cada una de las muestras fue purificada y permanecen contenidas en tubos de microcentrífuga en estado de congelación hasta el momento de su uso.

2.2.2 Determinación de la concentración y pureza del DNA de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae*.

Para conocer la concentración y pureza del DNA total de cada cepa de referencia y de las muestras de campo, se preparó una dilución de 1:100 en agua libre de nucleasas y se midió la absorbancia a 260nm y 280nm en un espectrofotómetro con luz UV.

2.2.3 Reacción de la Polimerasa en Cadena para amplificar un fragmento de DNA del gen RNAr 16S de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae*.

En primer lugar, se desarrolló la PCR para las cepas de referencias de MG y MS, con los controles negativos correspondientes. A continuación, se evaluó la especificidad de las pruebas, utilizando la cepa de referencia WVU1853 de MS en conjunto con los partidores específicos para MG y luego la cepa de referencia A5969 de MG en conjunto con los partidores específicos para MS. Posteriormente, se puso en práctica la técnica en las muestras de campo obtenidas de gallinas ponedoras.

Para cada prueba de PCR realizada a las cepas de referencia y a las muestras de campo, se preparó una mezcla de reacción para un número determinado de muestras, el cual contempló: un control positivo que llevaba el templado de DNA de la cepa de referencia correspondiente, un control negativo para MG o MS según corresponda (en cuyo caso, el volumen de templado de DNA es reemplazado por H₂O libre de nucleasas), en caso de las muestras de campo, el número total de las muestras a analizar.

Ambas mezclas, para MG y para MS se realizaron de forma independiente, debido a que los partidores son específicos para cada uno de ellos y no deben interferir unos con otros.

Es preciso señalar que el número de muestras a trabajar para cada PCR, se fijó en función de la capacidad de la cámara de electroforesis, que corresponde a un máximo de 14 muestras. Todo el proceso fue desarrollado en un área limpia y utilizando un juego de micropipetas exclusivas para tal fin.

Para la preparación de la mezcla de reacción de PCR de 45 µl cada una, se agregó lo siguiente: 35,75 µl de H₂O libre de nucleasas; 5,0 µl de tampón para PCR 10X; 1,0 µl de dNTP's 10 mM; 0,5 µl de partidor *forward* para MG o MS 2 µmoles/µl; 0,5 µl de partidor *reverse* para MG o MS 2 µmoles/µl; 0,25 µl de taq DNA polimerasa 5 U/µl; 2,0 µl de MgCl₂ 50 Mm. En cada tubo individual de microcentrífuga se alicuotaron 45 µl de la mezcla de reacción para PCR y luego se agregaron 5 µl de la muestra sospechosa de campo o del control positivo, según corresponda. En el caso de los controles negativos, los 5 µl de la muestra se sustituyeron por 5 µl de H₂O libre de nucleasas (Lauerman *et al.*, 1993; Lauerman, 1998; Kleven y Bradbury, 2008).

Luego, cada uno de los tubos fueron llevados al termociclador con el siguiente programa:

a) Un paso de desnaturalización de la doble hebra de DNA a 94°C durante 30 segundos, b) un paso de hibridación de los partidores a 57°C durante 30 segundos, c) un paso de extensión de las hebras simples con los desoxiribonucleótidos trifosfato a 72°C durante 60 segundos. Todo esto corresponde a un ciclo, de modo que se realizaron 40 ciclos consecutivos como el recién mencionado. Por último, un ciclo de extensión final a 72°C durante cinco minutos.

Finalizados todos los ciclos, se mantuvieron los productos de PCR a -20°C para ser trabajados posteriormente.

2.2.4 Electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Para una matriz de gel que rinde 14 muestras a analizar, se utilizó un gramo de agarosa en polvo y 50 ml de Buffer TAE 1X, esta mezcla se agitó y luego se fundió. Se agregó 2,5 µl de gel red a la solución, para luego dejar solidificar a temperatura de refrigeración por aproximadamente 40 minutos. Una vez sólido el gel, se instaló en la cámara de electroforesis y se cubrió por completo con Buffer TAE 1X.

Para corroborar el peso molecular de las bandas formadas, se utilizó un patrón o escala de pares de bases, disponible comercialmente, el cual se incorporó en el primer pocillo del gel de electroforesis, junto a las muestras a evaluar. En el caso del patrón o escala de pares de bases seleccionado para este estudio, éste genera bandas de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 pb.

Cada una de las cepas de referencia, muestras de campo y controles positivos y negativos, fueron mezclados cinco µl de producto de PCR con un µl de buffer de tinción de corrida DNA 6X. Cada una de estas muestras se dispuso a partir del segundo pocillo, a continuación de la escala de pares de bases. Luego, se sometió el gel a una diferencia de potencial de 80 Voltios durante 40 minutos (Lauerman *et al.*, 1993). Transcurrido el tiempo, se examinó el gel de agarosa al transiluminador ultravioleta y se tomó registro fotográfico de los resultados.

Para los partidores utilizados en este estudio, los productos de PCR para MG deberían presentar como resultado una banda de 185 pb (Kleven y Bradbury, 2008), los productos de PCR para MS deberían presentar como resultado una banda de 207 pb (Buim *et al.*, 2009; Lauerman, *et al.*, 1993).

VI. RESULTADOS

1. Ensayo de la técnica de PCR en cepas de referencia de *Mycoplasma gallisepticum* y de *Mycoplasma synoviae*.

1.1. Reconocimiento molecular de las cepas de referencia de *Mycoplasma gallisepticum* y de *Mycoplasma synoviae*.

Se utilizaron las cepas de referencia A5969 de *Mycoplasma gallisepticum* y WVU1853 de *Mycoplasma synoviae*, para demostrar la identificación del DNA de ambas bacterias.

De acuerdo a lo que señala Espinosa (2007), para considerar válida la prueba de PCR, se deben cumplir dos propósitos: En primer lugar, los controles positivos de MG y MS deben mostrar una banda de amplificación del peso molecular correspondiente. En segundo lugar, los controles negativos, que no llevan templado de DNA, no deben mostrar bandas.

Los resultados se ven reflejados en la Figura Nro. 1, donde se muestra la imagen de la electroforesis en gel de agarosa al 2%, para los productos de PCR de MG y MS. Los controles positivos evidencian bandas de amplificación, que coinciden con el peso molecular señalado en la literatura, que corresponde a 185 pb para MG (Kleven y Bradbury, 2008) (carril n°5) y 207 pb para MS (Buim *et al.*, 2009; Lauerma, *et al.*, 1993) (carril n°6). Tanto la banda de 185 pb (MG) como la banda de 207 pb (MS), coinciden con el marcador de peso molecular (carril n°1).

Los controles negativos de la prueba de PCR para MG (carril n°2) y para MS (carril n°3), que evalúan las cepas de referencia, no evidencian bandas de amplificación, descartando de este modo una posible contaminación de la mezcla de reacción.

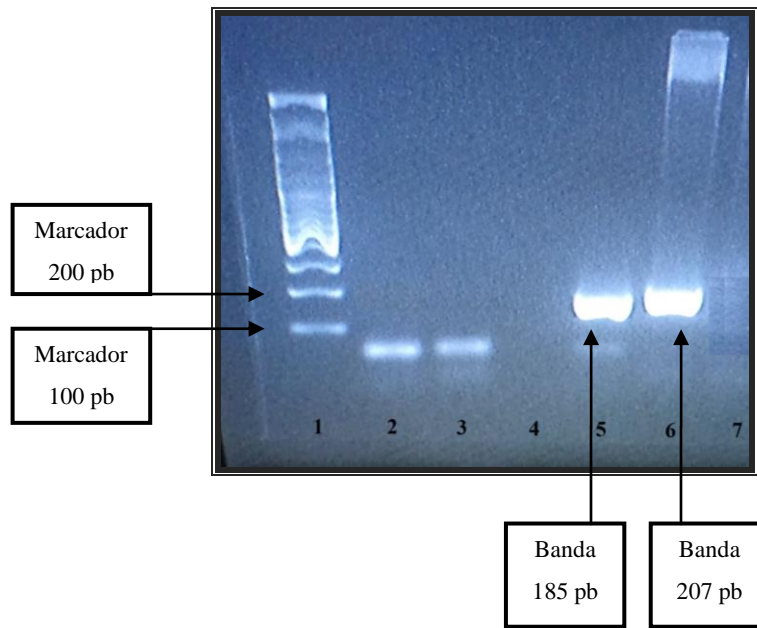


Figura Nro. 1: Reacción de la polimerasa en cadena para las cepas de referencia A5969 de MG y WVU1853 de MS. Carril n°1: Escala de 100 pares de bases; Carril n°5: Control positivo MG cepa A5969; Carril n°6: Control positivo MS cepa WVU1853; Carril n°2: Control negativo MG; Carril n°3: Control negativo MS.

1.2. Especificidad de la prueba de PCR para *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae*.

Para poner a prueba la especificidad de ambas pruebas de PCR, se realizó un intercambio entre los templados de DNA de MG y de MS y las mezclas de reacción de PCR, que utilizan partidores específicos para cada bacteria. Esto, con el objetivo de descartar una posible reacción cruzada entre los partidores de una bacteria, frente al DNA de la bacteria contraria.

1.2.1. Especificidad de la prueba de PCR para MG: DNA de MS vs partidores específicos para MG:

En la Figura N°2 A, se muestran los resultados de la prueba de reacción cruzada para evaluar la técnica de PCR para MG. Se puede apreciar en los carriles n°2 y n°5, los controles positivos de la reacción (DNA de MG cepa A5969/partidores para MG) que reflejan una banda de amplificación de 185 pb. En el carril n°3 se puede apreciar los resultados de la prueba de reacción cruzada que utiliza el templado de DNA de MS, frente a la mezcla de reacción de PCR, que lleva los partidores específicos para MG, en la cual no se visualizan bandas de amplificación. Lo que está evidenciando que no se produciría una reacción cruzada entre MG y MS, tal como se describe en la literatura consultada (García *et al.*, 2005). A continuación, en el carril n°4, se puede ver el control negativo de la reacción (mezcla de reacción con partidores para MG, sin templado de DNA), que no refleja bandas de amplificación.

1.2.2. Especificidad de la prueba de PCR para MS: DNA de MG vs partidores específicos para MS:

En la Figura N°2 B, se muestran los resultados de la prueba de reacción cruzada para evaluar la técnica de PCR para MS. Se puede apreciar en los carriles n°6 y n°9, los controles positivos de la reacción (DNA de MS cepa WVU1853/partidores para MS) que reflejan una banda de amplificación de 207 pb. En el carril n°7, se puede apreciar los resultados de la prueba de reacción cruzada que utiliza el templado el DNA de MG, frente a la mezcla de reacción de PCR, que lleva los partidores específicos para MS, en la cual no se visualizan bandas de amplificación. Lo que está evidenciando que no se produciría una reacción cruzada entre MG y MS, tal como se describe en la literatura consultada (Lauerman *et al.*, 1993). A continuación, en el carril n°8, se puede ver el control negativo de la reacción (mezcla de reacción con partidores para MS, sin templado de DNA), que no refleja bandas de amplificación.

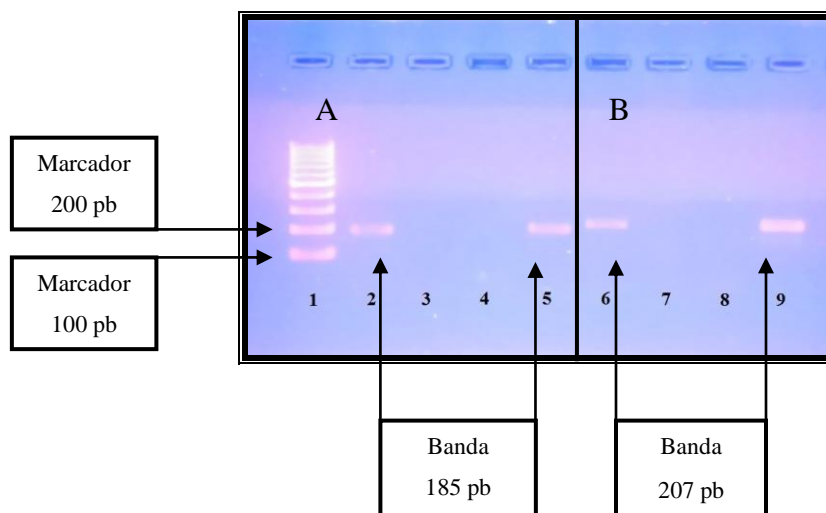


Figura Nro. 2: **A.** *Especificidad de la prueba de PCR para MG:* Carril n°1: Escala de 100 pb; Carril n°2 y Carril n°5: Controles positivos MG cepa A5969; Carril n°3: Prueba de reacción cruzada MG (Antígeno MS/partidores MG); Carril n°4: Control negativo MG (sin templado de DNA); **B.** *Especificidad de la prueba de PCR para MS:* Carril n°6 y Carril n°9: Controles positivos MS cepa WVU1853; Carril n°7: Prueba de reacción cruzada MS (Antígeno MG/partidores MS); Carril n°8: Control negativo MS (sin templado de DNA).

2. Ensayo de la técnica de PCR en muestras de campo de gallinas ponedoras, para el reconocimiento molecular del DNA de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae*.

Una vez que las cepas de referencia de MG y MS pudieron ser reconocidas por la técnica de PCR implementada, se procedió a ensayar la técnica en muestras de campo, tomadas desde gallinas ponedoras.

Se conocía previamente que los lotes de aves de postura muestreados, pertenecían a un plantel que había sido descrito como positivo a MG y a MS, según un estudio serológico que empleó la prueba de ELISA (Castillo, 2015). Las aves muestreadas eran productivamente sanas, sin embargo, cuando fue posible, para aumentar la posibilidad de

identificar el DNA de MG y de MS, se seleccionaron aves que presuntamente mostraban signos respiratorios, como aparente conjuntivitis o secreción nasal leve. No obstante, el número de aves sospechosas no superaba el 5% del total de aves muestreadas.

Se indican a continuación los resultados de la prueba de PCR para MG y de la prueba de PCR para MS de las muestras de campo. En la Tabla Nro. 1 se especifica la procedencia y número de identificación de cada una de las muestras de campo.

2.1. PCR para *Mycoplasma gallisepticum*.

- De las 50 muestras de tómulas traqueales tomadas, un total de 24 muestras (48%) fueron positivas a la prueba de PCR para a *Mycoplasma gallisepticum*, evidenciando una banda de 185 pb, aproximadamente, tal como señala la bibliografía consultada (Kleven y Bradbury, 2008).
- 26 muestras (52%) no presentaron bandas de amplificación, resultando negativas a la prueba de PCR para *Mycoplasma gallisepticum*.

2.2. PCR para *Mycoplasma synoviae*.

- De las 50 muestras de tómulas traqueales tomadas, un total de 6 muestras (12%) fueron positivas a la prueba de PCR para a *Mycoplasma synoviae*, evidenciando una banda de 207 pb, aproximadamente, tal como señala la bibliografía consultada (Lauerman *et al.*, 1993; Buim *et al.*, 2009).

- 44 muestras (88%) no presentaron bandas de amplificación, resultando negativas a la prueba de PCR para *Mycoplasma synoviae*.

De las muestras mencionadas, dos de ellas (4% del total de muestras) fueron positivas simultáneamente a *Mycoplasma gallisepticum* y a *Mycoplasma synoviae* (muestra n° 17 y muestra n°31).

En el Anexo N°1 se pueden consultar las imágenes digitales de los geles de electroforesis de las pruebas de PCR para MG, realizadas a las muestras de campo. En el Anexo N°2 se pueden consultar las imágenes correspondientes a los geles de electroforesis de las pruebas de PCR para MS.

Tabla Nro. 1: Resultados de las muestras de tómulas traqueales de gallinas ponedoras, sometidas a la prueba de PCR para *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae*. Se indica el número de identificación de cada una de las muestras, el pabellón de procedencia, y la edad de las aves que componen cada pabellón.

Número de identificación de la muestra	Pabellón	Edad (semanas)	Resultado a la PCR para MG	Resultado a la PCR para MS
1	Los Espinos 6	77	Negativo	Negativo
2	Los Espinos 6	77	Negativo	Negativo
3	Los Espinos 6	77	Negativo	Negativo
4	Los Espinos 6	77	Negativo	Positivo
5	Los Espinos 6	77	Negativo	Negativo
6	Los Espinos 6	77	Negativo	Positivo
7	Los Espinos 6	77	Negativo	Positivo
8	Los Espinos 6	77	Negativo	Positivo
9	Los Espinos 6	77	Negativo	Negativo
10	Los Espinos 4	85	Negativo	Negativo
11	Los Espinos 4	85	Negativo	Negativo
12	Los Espinos 4	85	Negativo	Negativo
13	Los Espinos 4	85	Negativo	Negativo
14	Los Espinos 4	85	Negativo	Negativo
15	Los Espinos 4	85	Negativo	Negativo
16	Los Espinos 4	85	Negativo	Negativo
17	Los Espinos 4	85	Positivo	Positivo
18	Los Espinos 4	85	Negativo	Negativo
19	Los Espinos 4	85	Negativo	Negativo
20	Los Espinos 4	85	Negativo	Negativo
21	Los Espinos 2	93	Positivo	Negativo
22	Los Espinos 2	93	Positivo	Negativo
23	Los Espinos 2	93	Positivo	Negativo
24	Los Espinos 2	93	Positivo	Negativo
25	Los Espinos 2	93	Positivo	Negativo
26	Los Espinos 2	93	Positivo	Negativo
27	Los Espinos 2	93	Positivo	Negativo
28	Los Espinos 2	93	Positivo	Negativo
29	Los Espinos 2	93	Positivo	Negativo
30	Los Espinos 2	93	Positivo	Negativo
31	Los Espinos 3	94	Positivo	Positivo
32	Los Espinos 3	94	Positivo	Negativo
33	Los Espinos 3	94	Positivo	Negativo
34	Los Espinos 3	94	Positivo	Negativo
35	Los Espinos 3	94	Positivo	Negativo
36	Los Espinos 3	94	Positivo	Negativo
37	Los Espinos 3	94	Positivo	Negativo
38	Los Espinos 3	94	Positivo	Negativo
39	Los Espinos 3	94	Positivo	Negativo
40	Los Espinos 3	94	Positivo	Negativo
41	Los Espinos 4	95	Positivo	Negativo
42	Los Espinos 4	95	Negativo	Negativo
43	Los Espinos 4	95	Positivo	Negativo
44	Los Espinos 4	95	Negativo	Negativo
45	Los Espinos 4	95	Negativo	Negativo
46	Los Espinos 4	95	Positivo	Negativo
47	Los Espinos 4	95	Negativo	Negativo
48	Los Espinos 4	95	Negativo	Negativo
49	Los Espinos 4	95	Negativo	Negativo
50	Los Espinos 4	95	Negativo	Negativo

VII. DISCUSIÓN

Un estudio chileno realizado por Castillo (2015), presentó valores de prevalencia de MG y de MS en una empresa de aves de postura de múltiples edades –la misma empresa en la cual se tomaron las muestras de campo para el presente estudio-, utilizando la prueba serológica de ELISA para MG y para MS. Según lo expuesto por el autor, el estudio demostró que en la medida que aumentaba la edad de las aves, aumentaba la prevalencia de MG y de MS. En las aves pertenecientes al grupo etario más joven se encontró un 44,6% de seropositividad a MG y un 36,7% de seropositividad a MS, mientras que en el grupo etario más maduro, se encontró una prevalencia de 70,1% para MG y un 94% para MS.

El trabajo de Castillo (2015), fue realizado tres años atrás, por lo tanto, las aves muestreadas en dicho estudio corresponden a una población diferente. Sin embargo, compartieron un ambiente común, según lo que han documentado los estudios y bibliografía consultada, en una granja de postura de múltiples edades, se ve favorecida la recirculación de patógenos desde las aves más viejas hacia las más jóvenes, de modo que la infección de MG y MS se vuelve endémica (Ewing *et al.*, 1996; Raviv *et al.*, 2007; Raviv y Ley, 2013). Es por esto que MG y MS deberían permanecer en la granja a través del tiempo, a causa del contacto directo e indirecto entre las aves que comparten un mismo ambiente y espacio geográfico.

En el presente estudio, se seleccionaron distintos pabellones del sector Los Espinos, el cual, durante el periodo de muestreo, estaba integrado por gallinas de 77 a 95 semanas de edad, al término de su ciclo productivo. Esto permitió ensayar la técnica de PCR implementada, sobre muestras de campo, de las cuales parte de ellas resultaron ser positivas, logrando identificar el DNA de MG en el 48% de las muestras y el DNA de MS en el 12% de las muestras. El 4% de las muestras resultaron ser positivas simultáneamente a MG y a MS.

El estudio de prevalencia realizado por Castillo (2015) reflejó una prevalencia general de 52,8% para MG y 71,1% para MS en el plantel de estudio. Estos valores de prevalencia, al igual que otros valores presentados en la bibliografía consultada (Mohammed *et al.*, 1986; Buim *et al.*, 2009; Servicio Agrícola y Ganadero, 2014a), señalan que de los distintos micoplasmas patógenos que infectan a las aves, es MS el que presenta valores más altos de prevalencia, superando a MG. Dichos números se contraponen a los encontrados en este estudio, por lo que debemos señalar que el objetivo de este trabajo fue implementar una técnica diagnóstica en cepas de referencia, y luego reproducirla en muestras obtenidas de campo. Para cumplir con los objetivos, de forma voluntaria se tomó muestras en un sector puntual del plantel, donde se consideró que pudiera haber mayor prevalencia de la infección, por lo que el muestreo fue dirigido a los sectores de aves más viejas. En ningún caso se realizó un muestreo aleatorio como sería lo indicado para un estudio de tipo estadístico, de tal manera que los números obtenidos (24 muestras positivas a MG y 6 muestras positivas a MS) de ninguna forma representan la prevalencia real de la micoplasmosis en el plantel avícola. Sin embargo, pese a esto, se ha logrado cumplir con los objetivos del estudio, que fue implementar la técnica de PCR a partir de cepas de referencia y posteriormente sobre muestras de campo.

Mohammed y colaboradores, en un estudio realizado en gallinas de postura comerciales utilizando la prueba de ELISA, indican que se pueden presentar distintos porcentajes de prevalencia de la infección de MG y MS, los cuales varían de acuerdo a diferentes factores de riesgo asociados, como son la edad, medicación con antibióticos, manejo bajo sistema de edades múltiples y presencia de infecciones simultáneas. En las 103 granjas de pollitas y ponedoras adultas evaluadas (representativo de una población de 2,9 millones de aves de postura) la prevalencia de MG varió entre un 10 y un 90%, mientras que la prevalencia para MS fluctuó entre un 20 y un 100%. Además, los autores señalan que la mayoría de los lotes de aves estudiados, no presentaron signología de tipo respiratoria, lo que puede ser explicado por las variaciones en patogenicidad que presentan las distintas cepas de MG (Mohammed *et al.*, 1986).

Los datos presentados por Mohammed y colaboradores (1986), reflejan que se puede encontrar valores de prevalencia de la infección de MG y MS altos, intermedios o bajos, sin necesariamente encontrar signología asociada. De igual forma que ocurrió en los lotes de gallinas muestreados en el presente estudio, los cuales pertenecían a un sector específico de la granja, compuesto por una población de aves clínica y productivamente sanas. Esto se pudo constatar en los índices productivos (porcentaje de postura, consumo de alimento, peso corporal, peso de huevo, etc. datos no mostrados) que figuraban en los registros internos de la empresa. Además, los factores de riesgo asociados al manejo realizado en el plantel, no fueron considerados en este estudio, por lo que podría haber alguna influencia de ellos sobre la prevalencia esperada de MG y de MS, actuando de manera incierta sobre los resultados obtenidos en nuestro estudio, logrando de alguna forma registrar más casos positivos de infección producida por MG.

Según el estudio de Lauerma y colaboradores, la PCR para MS mostró una sensibilidad de 82% y fue capaz de amplificar el DNA de MS a partir de muestras con una carga bacteriana equivalente a 100 unidades formadoras de colonias (UFC) (Lauerma *et al.*, 1993). Este punto resulta ser especialmente importante en casos en que la micoplasmosis se vuelve crónica, ya que los patógenos tienden a desaparecer del tracto respiratorio alto, haciéndose más difícil su detección. Si eventualmente la carga bacteriana fuera menor a lo requerido por la prueba diagnóstica, no se puede descartar la posibilidad de ocurrencia de resultados falsos negativos. La bibliografía señala que en estados agudos de la infección son suficientes las tómulas de tráquea o seno palatino de 10 a 20 aves vivas para recuperar el organismo, mientras que en etapas crónicas de la enfermedad pueden ser requeridos 30 a 100 muestras para identificarlo (Ferguson-Noel y Noormohammadi, 2013). De acuerdo a estas recomendaciones se decidió tomar un número de 50 muestras, compuestas cada una por cuatro tómulas, lo que representa un total de 200 gallinas, aumentando la posibilidad de detección del DNA de micoplasmas aviares a nivel de campo.

Igualmente, se ha descrito que la especificidad de las pruebas de PCR que amplifican fragmentos de la secuencia del gen que codifica el rRNA 16S es alta, según Lauerman y colaboradores (1993) puede llegar al 100%. En su estudio se puso a prueba distintas especies de micoplasmas aviares para verificar la posibilidad de reacción cruzada entre ellas. El resultado del estudio de Lauerman mostró que no ocurrían reacciones cruzadas entre MS y las 44 cepas y especies distintas analizadas, incluyendo MG.

Una dificultad que presenta la prueba de PCR, es que para la obtención de resultados correctos, el procedimiento y la manipulación de los reactivos y de los materiales debe ser cuidadoso y preciso, ya que se trabaja con reactivos sensibles a los cambios de temperatura y con volúmenes reducidos. Por ejemplo, la desnaturalización de la enzima Taq polimerasa es un punto crítico durante el desarrollo de la prueba, es extremadamente sensible a la temperatura y necesita ser mantenida dentro de compartimentos que la protejan de la descongelación. Según Espinosa (2007), cualquier error en el procedimiento, deterioro o falta de alguno de los constituyentes (ácidos nucleicos, enzima o buffers) imposibilitarán la reacción, invalidando los resultados. Es por esto que se recomienda el uso de los controles positivos y negativos de la reacción, los cuales no impedirán errores o mal desarrollo de la técnica, pero si harán evidente que hubo una falla. Un control positivo que no presente banda de amplificación de DNA, reflejará que hubo algún error u omisión de un reactivo o del templado de DNA. Mientras que un control negativo con presencia de bandas reflejará la presencia de contaminación con DNA durante el proceso de la prueba. Si falla uno o ambos controles, se invalidarán automáticamente los resultados obtenidos.

Según lo señalado por Belak y Thorén (2008), el diagnóstico de las enfermedades infecciosas puede ser realizado mediante la detección directa o indirecta de los agentes infecciosos. Mediante los métodos directos se puede identificar el agente infeccioso *per se*, o parte de sus componentes, como los ácidos nucleicos o proteínas estructurales. Dentro ellos se puede mencionar: el aislamiento y cultivo *in vitro*, inmunofluorescencia y las técnicas de diagnóstico molecular como la PCR. Por otro lado, los métodos indirectos no

buscan el agente infeccioso como tal, sino más bien, demuestran que en un momento dado, hubo contacto con el agente, a través de la manifestación de la respuesta inmune o de la presencia de anticuerpos específicos inducidos posterior a la infección. Los métodos más comunes de detección indirecta de los agentes infecciosos son los métodos serológicos de ELISA indirecto, inhibición de la hemoaglutinación, o neutralización del virus.

De acuerdo a lo recién mencionado, la posibilidad de encontrar anticuerpos específicos contra MG o MS, indica que en algún momento, reciente o remoto, hubo contacto entre el individuo y el patógeno específico, el cual podría no estar presente en el momento en que se realice el análisis serológico. De modo que podríamos encontrar serología positiva, al mismo tiempo que pruebas de identificación directa con resultados negativos. Tal como ocurrió en un estudio realizado por Yagihashi y Tajima (1986). En este estudio se vio que los anticuerpos presentes en la secreción extraída del tracto respiratorio de pollos white leghorn fueron capaces de prevenir la colonización del aparato respiratorio por parte de MG. Un grupo de pollos re-infectados con MG (infectados por segunda vez con la misma cepa) aumentaron, o mantuvieron títulos altos de anticuerpos específicos contra MG (medidos a través de la prueba de ELISA, IHA y aglutinación en tubo). Al mismo tiempo que presentaron tasas significativamente menores de aislamiento de la bacteria (14 días post infección, una de cada cinco aves re-infectadas era positivo para MG, mientras que los cinco aves infectadas por primera vez fueron positivos para MG).

Las condiciones ambientales existentes en un plantel de gallinas de postura de múltiples edades –donde la infección por MG y MS es considerada endémica– y las aves son constantemente desafiadas por estos y otros patógenos, la re-infección de las aves con MG y MS es permanente. La experiencia presentada por Yagihashi y Tajima (1986) refleja la posibilidad de encontrar resultados contrapuestos, de acuerdo al tipo de prueba diagnóstica utilizada. Por lo mismo, sería conveniente compatibilizar distintos tipos de pruebas diagnósticas, a fin de lograr una mejor perspectiva de la situación. Las pruebas serológicas, si bien no evidencian la presencia *in situ* del agente infeccioso, representan una herramienta

más accesible para ser utilizada en poblaciones numerosas y pueden ser empleadas como prueba de *screening*. Mientras que una prueba de tipo directo, como es el caso de la PCR, pueden ser aplicadas a un número más reducido de muestras y ser utilizado como prueba confirmatoria. En consecuencia, ambas técnicas pueden complementarse, brindando cada una sus atributos: mayor facilidad en el desarrollo de la prueba, menor costo económico, rapidez en la obtención de resultados, aplicación masiva o restringida, mayor sensibilidad o especificidad requerida y según los objetivos que esperamos lograr a través del diagnóstico realizado (estudio de prevalencia o eliminación de aves reproductoras positivas).

VIII. CONCLUSIÓN

Fue posible implementar en el Laboratorio de Patología Aviaria, de la Universidad de Chile, la técnica de PCR para identificar el DNA de *Mycoplasma gallisepticum* y de *Mycoplasma synoviae*, a partir de las cepas de referencia A5969 y WVU1853, respectivamente.

Posteriormente, la técnica de PCR implementada fue capaz de identificar el DNA de *Mycoplasma gallisepticum* y de *Mycoplasma synoviae* proveniente de muestras de campo obtenidas desde un lote de gallinas de postura.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- **AMIT-ROMACH, E.; SKLAN, D.; UNI, Z. 2004.** Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. *Poult. Sci.* 83: 1093 – 1098.

- **ANÓN. 1984.** 100 years of animal health, production and welfare 1884 – 1984. [en línea] **In:** Poultry improvement. Partners in progress. <<https://babel.hathitrust.org/cgi/pt?id=umn.31951d017386274;view=1up;seq=1>> [consulta: 08-06-2016].

- **BEJ, A. K.; MANHUBANI, M. H.; ATLAS, R. M. 1991.** Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Bio.* 26 (3 - 4): 301 – 334.

- **BELAK, S.; THORÉN, P. 2008.** Validation and quality control of polymerase chain reaction methods used for the diagnosis of infectious diseases. [en línea] cap. 1.1.5 **In:** OIE Terrestrial Manual. <http://web.oie.int/eng/normes/MANUAL/2008/pdf/1.1.05_VALID_PCR.pdf> [consulta: 20-07-2016].

- **BRADBURY, J. M.; MORROW, C. 2008.** Avian Mycoplasmas. **In:** Pattison, M.; McMullin, P.; Bradbury, J.M.; Alexander, D. (Eds.) *Poultry Diseases*. 6th ed. Elsevier 's Health Sciences Rights Department. Philadelphia, USA. 220 p.

- **BRADBURY, J. M.; SAED ABDUL-WAHAB, O. M.; YAVARI, C. A.; DUPIELLET, J.; BOVÉ, J. M. 1993.** *Mycoplasma imitans* sp. nov. Is related to *Mycoplasma gallisepticum* and found in birds. *Int. J. of Syst. Bacteriol.* 43 (4): 721 – 728.

- **BUIM, M. R.; METTIFOGO, E.; TIMENETSKY, J.; KLEVEN, S.; PIANTINO, A. J. 2009.** Epidemiological survey on *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* by multiplex PCR in commercial poultry. *Pesq. Vet. Bras.* 29 (7): 552 – 556.

- **CARLI, T.; EYIGOR, A. 2003.** Real-time polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum* in chicken trachea. Avian Dis. 47: 712 – 717.

- **CARRIÓN, L. J.; BALDRICH, R.; RAMIREZ, G. C.; VERA, V. J. 2012.** Diferenciación de cepas de *Mycoplasma gallisepticum* a partir de RFLP. Rev. Med. Vet. ISSN 0122-9354 24 (2): 113 – 121.

- **CASTILLO, F. I. 2015.** Determinación de la seroprevalencia de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* en una empresa de aves de postura de múltiples edades. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs Veterinarias y Pecuarias. 48 p.

- **CHAKRAVORTY, S.; HELB, D.; BURDAY, M.; CONNELL, N.; ALLAND, D. 2007.** A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. J. Microbiol. Methods 69 (2): 330 – 339.

- **CHARLTON, B. R.; BICKFORD, A. A.; WALKER, R. L.; YAMAMOTO, R. 1999.** Complementary randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis patterns and primer sets to differentiate *Mycoplasma gallisepticum* strains. J. Vet. Diagn. Invest. 11: 158 – 161.

- **CHARLTON, B. R.; BICKFORD, A. A.; CHIN, R. P.; WALKER, R. L. 1999b.** Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Mycoplasma gallisepticum* isolates from turkeys from the central valley of California. J. Vet. Diagn. Invest. 11: 408 – 415.

- **EHTISHAM-UL-HAQUE, S.; RAHMAN, S. U.; SIDDIQUE, M.; QURESHI, A. S. 2011.** Involvement of *Mycoplasma synoviae* in respiratory distress cases of broilers. Pak Vet J. 31(2): 117 – 119.

- **ESPINOSA, L. 2007.** Guía práctica sobre la técnica de PCR. **In:** Eguiarte, L. E.; Souza, V.; Aguirre, X. (Eds.). Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT. México, D. F. 517 p.

- **EWING, M. L.; LAUERMAN, L. H.; KLEVEN, S. H.; BROWN, M. B. 1996.** Evaluation of diagnostic procedures to detect *Mycoplasma synoviae* in commercial multiplier-breeder farms and commercial hatcheries in Florida. *Avian Dis.* 40 (4): 798 – 806.

- **EWING, M. L.; COOKSON, K. C.; PHILLIPS, R. A.; TURNER, K. R.; KLEVEN, S. H. 1998.** Experimental infection and transmissibility of *Mycoplasma synoviae* with delayed serologic response in chickens. *Avian Dis.* 42: 230 – 238.

- **FEBERWEE, A.; MEKKES, D. R.; DE WIT, J. J.; HARTMAN, E. G.; PIJPERS, A. 2005.** Comparison of culture, PCR, and different serologic tests for detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* infections. *Avian Dis.* 49 (2): 260 – 268.

- **FEBERWEE, A.; DE WIT, J. J.; LANDMAN, W. J. M. 2009.** Induction of eggshell apex abnormalities by *Mycoplasma synoviae*: field and experimental studies. *Avian Pathol.* 38 (1): 77 – 85.

- **FERGUSON-NOEL, N. 2013.** Mycoplasmosis. **In:** Swayne, D. E.; Glisson, J. M.; McDougald, L. R.; Nolan, L. K.; Suarez, D. L.; Nair, V. (Eds.). *Diseases of Poultry.* 13th ed. John Wiley & Sons, Inc. Ames, USA. 2868 p.

- **FERGUSON-NOEL, N.; NOORMOHAMMADI, A. H. 2013.** *Mycoplasma synoviae* infection. **In:** Swayne, D. E.; Glisson, J. M.; McDougald, L. R.; Nolan, L. K.; Suarez, D. L.; Nair, V. (Eds.). *Diseases of Poultry.* 13th ed. John Wiley & Sons, Inc. Ames, USA. 2947 p.

- **FERNÁNDEZ, C.; MATTSSON, J. G.; BÖLSKE, G.; LEVISOHN, S.; JOHANSSON, K. E. 1993.** Species-specific oligonucleotide probes complementary to 16S rRNA of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. Res. Vet. Sci. 55: 130 – 136.

- **GARCÍA, M.; IKUTA, N.; LEVISOHN, S.; KLEVEN, S. 2005.** Evaluation and comparison of various PCR methods for detection of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. Avian Dis. 49: 125 – 132.

- **GARIBYAN, L.; AVASHIA, N. 2013.** Research techniques made simple: Polymerase chain reaction (PCR). J. Invest. Dermatol. 133 (3): e6. doi:10.1038/jid.2013.1. 1 – 8.

- **GRODIO, J. L.; HAWLEY, D. M.; OSNAS, E. E.; LEY, D. H.; DHONDT, K. V.; DHONDT, A. A.; SCHAT, K. A. 2012.** Pathogenicity and immunogenicity of three *Mycoplasma gallisepticum* isolates in house finches (*Carpodacus mexicanus*). Vet. Microbiol. 155: 53 – 61.

- **HANIF, A.; NAJEEB, M. I. 2007.** Comparison of conventional bacterial isolation, rapid slide agglutination and polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum* in breeder flocks. Pak. J. Life Soc. Sci. 5(1-2): 1 – 5.

- **HARASAWA, R.; PITCHER, D. G.; RAMIREZ, A. S.; BRADBURY, J. M. 2004.** A putative transposase gene in the 16S-23S rRNA intergenic spacer region of *Mycoplasma imitans*. Microbiology 150 (4): 1023 – 1029.

- **HOLZBAUER, S. 2004.** History of the control program. [en línea] **In:** National Poultry Improvement Plan. USDA APHIS VS Career Services Program. Program Diseases Training Module. <<https://aglearn.usda.gov/customcontent/APHIS/Disposal/Program%20Disease/imagenes/ovrPoultry.pdf>> [consulta: 08-06-2016].

- **HONG, Y.; GARCIA, M.; LEITING, V.; BENCINA, D.; DUFOUR-ZAVALA, L.; ZAVALA, G.; KLEVEN, S. 2004.** Specific detection and typing of *Mycoplasma synoviae* strains in poultry with PCR and DNA sequence analysis targeting the hemagglutinin encoding gene *vlhA*. Avian Dis. 48: 606 – 616.

- **ISLAM, A.; ASLAM, A.; CHAUDHRY, Z. I.; AHMED, M. U. D.; REHMAN, H. U.; SAEED, K.; AHMED, I. 2011.** Pathology of *Mycoplasma gallisepticum* in naturally infected broilers and its diagnosis through PCR. Int. J. Agric. Biol. 13 (4): 835 – 837.

- **JARQUIN, R.; SCHULTZ, J.; HANNING, I.; RICKE, S. C. 2009.** Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the simultaneous detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* under industry conditions. Avian Dis. 53(1): 73 – 77.

- **KEMPF, I. 1998.** DNA amplification methods for diagnosis and epidemiological investigations of avian mycoplasmosis. Avian Pathol. 27 (1): 7 – 14.

- **KHIARI, A. B.; LANDOULSI, A.; AISSA, H.; MLIK, B.; AMOUNA, F.; EJLASSI, A.; MARDASSI, B. B. A. 2011.** Isolation of *Mycoplasma meleagridis* from Chickens. Avian Dis. 55(1): 8 – 12.

- **KLEPPE, K.; OHTSUKA, E.; KLEPPE, R.; MOLINEUX, I.; KHORANA, H. 1971.** Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. J. Mol. Biol. (56): 341 – 361.

- **KLEVEN, S. H.; FLETCHER, O. J.; DAVIS, R. B. 1975.** Influence of strain of *Mycoplasma synoviae* and route of infection on development of synovitis or airsacculitis in broilers. Avian Dis. 19: 126 – 135.

- **KLEVEN, S. H. 1985.** Tracheal populations of *Mycoplasma gallisepticum* after challenge of bacterin-vaccinated chickens. Avian Dis. 29:1012 – 1017.

- **KLEVEN, S. H. 2008.** Control of avian Mycoplasma infections in commercial poultry. *Avian Dis.* 52: 367 – 374.

- **KLEVEN, S. H.; BRADBURY, J. M. 2008.** Avian Mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*). [en línea] cap. 2.3.5. **In:** OIE Terrestrial Manual. <<http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>> [consulta: 04-06-2013].

- **LAM, K. M. 2003.** Scanning electron microscopic studies of *Mycoplasma gallisepticum* infection in embryonic tracheae. *Avian Dis.* 47: 193 – 196.

- **LAUERMAN, L. H.; HOERR, F. J.; SHARPTON, A. R.; SHAH, S. M.; VAN SANTEN, V. L. 1993.** Development and application of a polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis.* 37: 829 – 834.

- **LAUERMAN, L. H. 1998.** *Mycoplasma* PCR assays. **In:** Nucleic amplification assays for diagnosis of animal diseases. American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians. Auburn, USA. 41 – 52.

- **LEVISOHN, S.; KLEVEN, S. H. 2000.** Avian Mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*). *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 19 (2): 425 – 434.

- **LEY, D. H.; BERKHOFF, J. E.; MCLAREN, J. M. 1996.** *Mycoplasma gallisepticum* isolated from house finches (*Carpodacus mexicanus*) with conjunctivitis. *Avian Dis.* 40: 480 – 483.

- **MAROIS, C.; DUFOUR-GESBERT, F.; KEMPF, I. 2000.** Detection of *Mycoplasma synoviae* in poultry environment samples by culture and polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 73 (4): 311 – 318.

- **METTIFOGO, E.; BUZINHANI, M.; BUIM, M. R.; PIANTINO FERREIRA, A. J.; KLEVEN, S. H.; TIMENETSKY, J. 2006.** Molecular characterization of *Mycoplasma gallisepticum* isolates using RAPD and PFGE isolated from chickens in Brazil. *J. Vet. Med. B* 53(9): 445 – 450.

- **MOALIC, P. I.; KEMPF, I.; GESBERT, F.; LAIGRET, F. 1997.** Identification of two pathogenic avian mycoplasmas as strains of *Mycoplasma pullorum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47 (1): 171 – 174.

- **MOHAMMED, H. O.; CARPENTER, T. E.; YAMAMOTO, R.; MCMARTIN, D. A. 1986.** Prevalence of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* in commercial layers in southern and central California. *Avian Dis.* 30 (3): 519 – 526.

- **MOHAMMED, H. O.; CARPENTER, T. E.; YAMAMOTO, R. 1987.** Evaluation of factors associated with infection of commercial layers with *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae*. *Avian Dis.* 31 (3): 470 – 476.

- **MOSCOSO, H.; THAYER, S. G.; HOFACRE, C. L.; KLEVEN, S. H. 2004.** Inactivation, storage, and PCR detection of *Mycoplasma* on FTA® filter paper. *Avian Dis.* 48 (4): 841 – 850.

- **MULLIS, K. 1990.** Amplification techniques and specific applications of the polymerase chain reaction method. *Clin. Biochem.* 23(4): 307 – 308.

- **PANG, Y.; WANG, H.; GIRSHICK, T.; XIE, Z.; KHAN, M. I. 2002.** Development and application of a multiplex polymerase chain reaction for avian respiratory agents. *Avian Dis.* 46 (3): 691 – 699.

- **POURBAKSH, S. A.; SHOKRI, G. R.; BANANI, M.; ELHAMNIA, F.; ASHTARI, A. 2010.** Detection of *Mycoplasma synoviae* infection in broiler breeder farms of Tehran province using PCR and culture methods. *Archives of Razi.* 65 (2): 75 – 81.

- **POVEDA, J. B.; CARRANZA, J.; MIRANDA, A.; GARRIDO, A.; HERMOSO, M.; FERNÁNDEZ, A.; DOMENECH, J. 1990.** An epizootiological study of avian mycoplasmas in Southern Spain. *Avian Pathol.* 19 (4): 627 – 633.

- **RAUF, M.; CHAUDHARY, Z. I.; YOUNUS, M.; ANJUM, A. A.; ALI, M. A.; AHMAD, A. N.; KHAN, M. U. R. 2013.** Identification of *Mycoplasma gallisepticum* by polymerase chain reaction and conventional diagnostics from white leghorn layer flocks. *J. Anim. Plant Sci.* 23(2): 393 – 397.

- **RAVIV, Z.; FERGUSON-NOEL, N.; LAIBINIS, V.; WOOTEN, R.; KLEVEN, S. H. 2007.** Role of *Mycoplasma synoviae* in commercial layer *Escherichia coli* peritonitis syndrome. *Avian Dis.* 51 (3): 685 – 690.

- **RAVIV, Z.; KLEVEN, S. H. 2009.** The development of diagnostic Real – Time TaqMan PCRs for the four pathogenic avian Mycoplasmas. *Avian Dis.* 53: 103 – 107.

- **RAVIV, Z.; LEY, D. H. 2013.** *Mycoplasma gallisepticum* infection. **In:** Swayne, D. E.; Glisson, J. M.; McDougald, L. R.; Nolan, L. K.; Suarez, D. L.; Nair, V. (Eds.). *Diseases of Poultry.* 13th ed. John Wiley & Sons, Inc. Ames, USA. 2873 p.

- **RAZIN, S. 1985.** Molecular biology and genetics of mycoplasmas (Mollicutes). *Microbiol. Rev.* 49 (4): 419 – 455.

- **RODICIO, M. R.; MENDOZA, M. C. 2004.** Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 22 (4): 238 – 245.

- **SALISCH, H.; HINZ, K. H.; GRAACK, H. D.; RYLL, M. 1998.** A comparison of a commercial PCR-based test to culture methods for detection of *Mycoplasma*

gallisepticum and *Mycoplasma synoviae* in concurrently infected chickens. Avian Pathol. 27: 142 – 147.

- **SALISCH, H.; HINZ, K. H.; NEUMANN, U. 1999.** Experiences with multispecies polymerase chain reaction and specific oligonucleotide probes for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. Avian Pathol. 28 (4): 337 – 344.

- **SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO. 2005.** Situación Sanitaria Animal Chile 2004. [en línea] <<http://www.sag.gob.cl/ambitos-de-accion/situacion-sanitaria-nacional>> [consulta 10-06-2016].

- **SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO. 2009a.** Programas de control y certificación. Procedimiento: Programa de Control de *Mycoplasma sp.* en planteles comerciales de aves. Servicio Agrícola y Ganadero. [en línea] <<http://www.sag.cl/ambitos-de-accion/programas-voluntarios-de-control-y-certificacion>> [consulta 22-10-2014].

- **SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO. 2009b.** Informe sanidad animal Chile año 2009. [en línea] <<http://www.sag.gob.cl/ambitos-de-accion/situacion-sanitaria-nacional>> [consulta 10-06-2016].

- **SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO. 2014a.** Informe sanidad animal Chile año 2014. [en línea] <<http://www.sag.gob.cl/ambitos-de-accion/situacion-sanitaria-nacional>> [consulta 21-04-2016].

- **SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO. 2014b.** Lista de enfermedades de denuncia obligatoria (EDO) al SAG. [en línea] < <http://www.sag.cl/ambitos-de-accion/vigilancia-de-enfermedades>> [consulta 28-04-2016].

- **SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO. 2014c.** Informe semestral para la notificación de la presencia de enfermedades de la lista de la OIE. [en línea]

<[http://www.sag.gob.cl/ambitos-de-accion/sanidad-animal/107/publicaciones?field_tema_otros_documentos_tid=2180&field_tipo_de_publicacion_tid=247&title=Notificaci%C3%B3n+de+ausencia%2Fpresencia+de+enfermedades+de+la+lista+OIE&field_fecha_otros_value\[value\]\[year\]=&items_per_page=All](http://www.sag.gob.cl/ambitos-de-accion/sanidad-animal/107/publicaciones?field_tema_otros_documentos_tid=2180&field_tipo_de_publicacion_tid=247&title=Notificaci%C3%B3n+de+ausencia%2Fpresencia+de+enfermedades+de+la+lista+OIE&field_fecha_otros_value[value][year]=&items_per_page=All)> [consulta 28-04-2016].

- **SILVEIRA, R. M.; FIORENTIN, L.; MARQUES, E. K. 1996.** Polymerase chain reaction optimization for *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* diagnosis. Avian Dis. 40: 218 – 222.

- **SPRYGIN, A. V.; ANDREYCHUK, D. B.; KOLOTILOV, A. N.; VOLKOV, M. S.; RUNINA, I. A.; MUDRAK, N. S.; BORISOV, A. V.; IRZA, V. N.; DRYGIN, V. V.; PEREVOZCHIKOVA, N. A. 2010.** Development of a duplex real-time TaqMan PCR assay with an internal control for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in clinical samples from commercial and backyard poultry. Avian Pathol. 39 (2): 99 – 109.

- **STIPKOVITS, L.; SZATHMARY, S. 2012.** *Mycoplasma* infection of ducks and geese. Poultry Sci. 91: 2812 – 2819.

- **WANG, H.; FADL, A. A.; KHAN, M. I. 1997.** Multiplex PCR for avian pathogenic mycoplasmas. Mol. Cell. Probes 11(3): 211 – 216.

- **WINNER, F.; ROSENGARTEN, R.; CITTI, C. 2000.** In vitro cell invasion of *Mycoplasma gallisepticum*. Infect. Immun. 68 (7): 4238 – 4244.

- **YAGIHASHI, T.; TAJIMA, M. 1986.** Antibody responses in sera and respiratory secretions from chickens infected with *Mycoplasma gallisepticum*. Avian Dis. 30 (3): 543 – 550.

X. ANEXOS

Anexo Nro. 1: Electroforesis en gel de agarosa al 2%, sometida al transiluminador Ultra Violeta. En las imágenes se muestran las bandas de los amplicones del fragmento del gen RNA ribosomal 16S de *Mycoplasma gallisepticum*, cuyo peso molecular es de 185 pb. Cada grupo de muestras de campo son acompañados por sus correspondientes controles negativos y positivos.

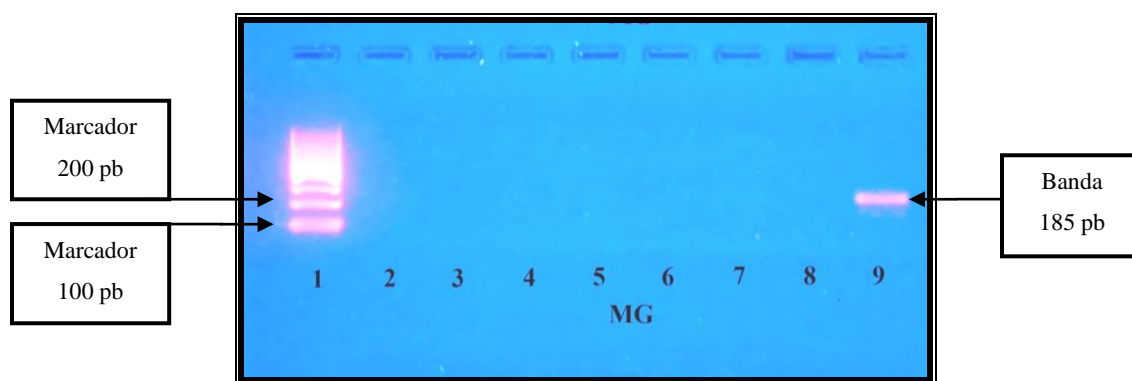


Figura Nro. 3: Reacción de la Polimerasa en Cadena para *Mycoplasma gallisepticum* de las muestras 1 – 6.

Carril n°1: Escala de 100 pb; Carril n°2: muestra 1; Carril n°3: muestra 2; Carril n°4: muestra 3; Carril n°5: muestra 4; Carril n°6: muestra 5; Carril n°7: muestra 6; Carril n°8: Control Negativo; Carril n°9: Control Positivo *Mycoplasma gallisepticum* cepa A5969.

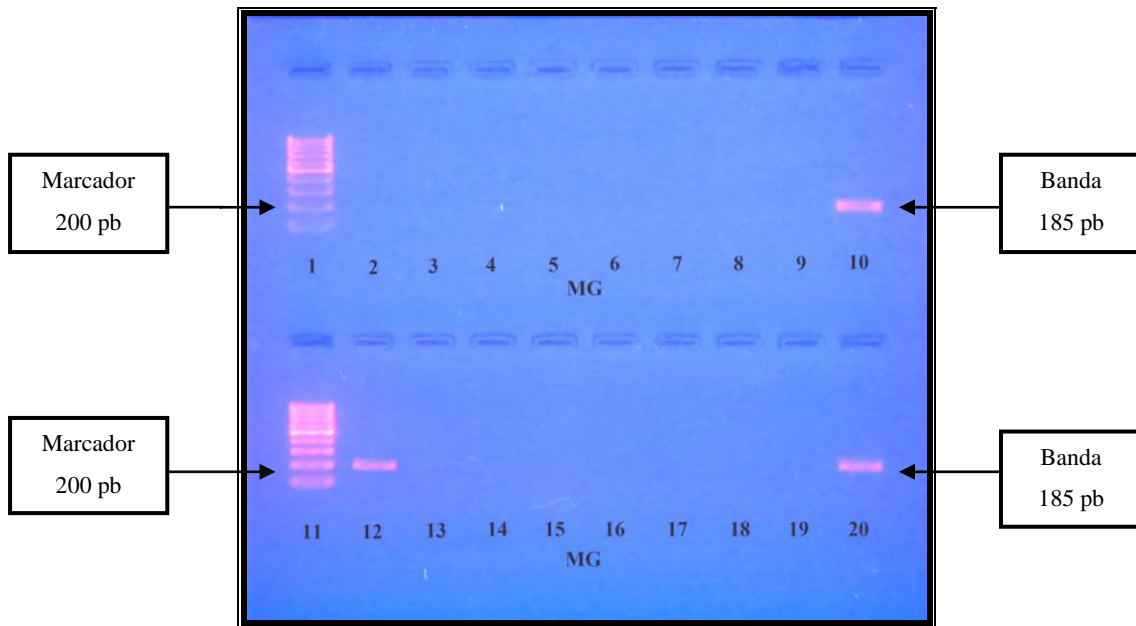


Figura Nro. 4: Reacción de la Polimerasa en Cadena para *Mycoplasma gallisepticum* de las muestras 7 – 20.

Fila superior: Carril n°1: Escala de 100 pb; Carril n°2: muestra 10; Carril n°3: muestra 11; Carril n°4: muestra 12; Carril n°5: muestra 13; Carril n°6: muestra 14; Carril n°7: muestra 15; Carril n°8: muestra 16; Carril n°9: Control Negativo; Carril n°10: Control Positivo *Mycoplasma gallisepticum* cepa A5969.

Fila inferior: Carril n°11: Escala de 100 pb; Carril n°12: muestra 17 (Positiva); Carril n°13: muestra 18; Carril n°14: muestra 19; Carril n°15: muestra 20; Carril n°16: muestra 7; Carril n°17: muestra 8; Carril n°18: muestra 9; Carril n°19: Control Negativo; Carril n°20: Control Positivo *Mycoplasma gallisepticum* cepa A5969.

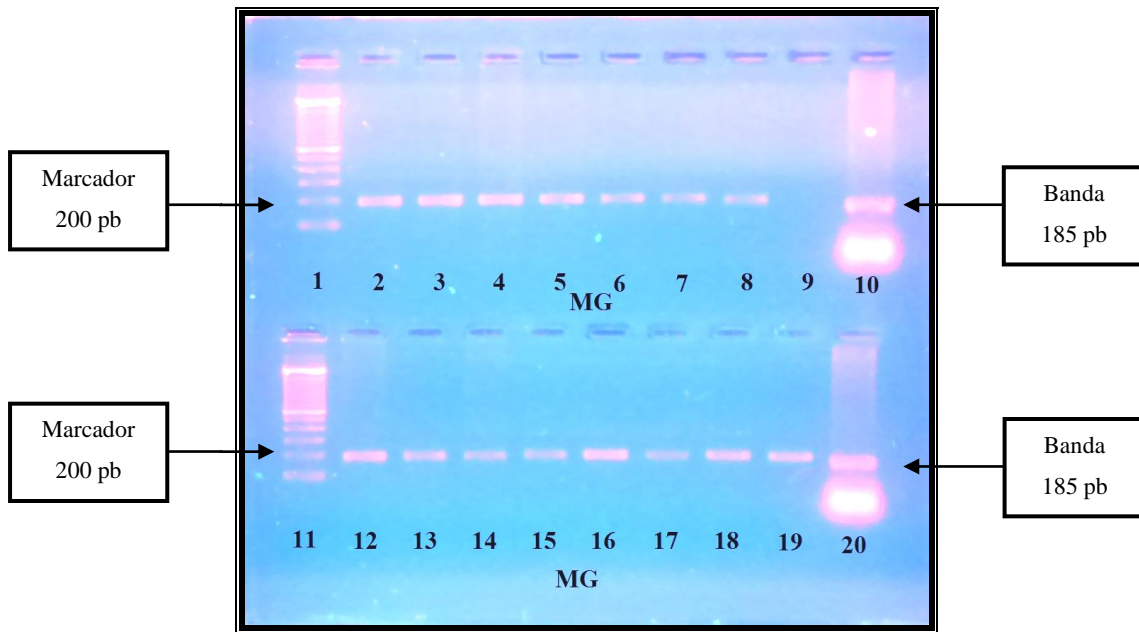


Figura Nro. 5: Reacción de la Polimerasa en Cadena para *Mycoplasma gallisepticum* de las muestras 21 – 35.

Fila superior: Carril n°1: Escala de 100 pb; Carril n°2: muestra 21 (Positiva); Carril n°3: muestra 22 (Positiva); Carril n°4: muestra 23 (Positiva); Carril n°5: muestra 24 (Positiva); Carril n°6: muestra 25 (Positiva); Carril n°7: muestra 26 (Positiva); Carril n°8: muestra 27 (Positiva); Carril n°9: Control Negativo; Carril n°10: Control Positivo *Mycoplasma gallisepticum* cepa A5969.

Fila inferior: Carril n°11: Escala de 100 pb; Carril n°12: muestra 28 (Positiva); Carril n°13: muestra 29 (Positiva); Carril n°14: muestra 30 (Positiva); Carril n°15: muestra 31 (Positiva); Carril n°16: muestra 32 (Positiva); Carril n°17: muestra 33 (Positiva); Carril n°18: muestra 34 (Positiva); Carril n°19: muestra 35 (Positiva); Carril n°20: Control Positivo *Mycoplasma gallisepticum* cepa A5969.

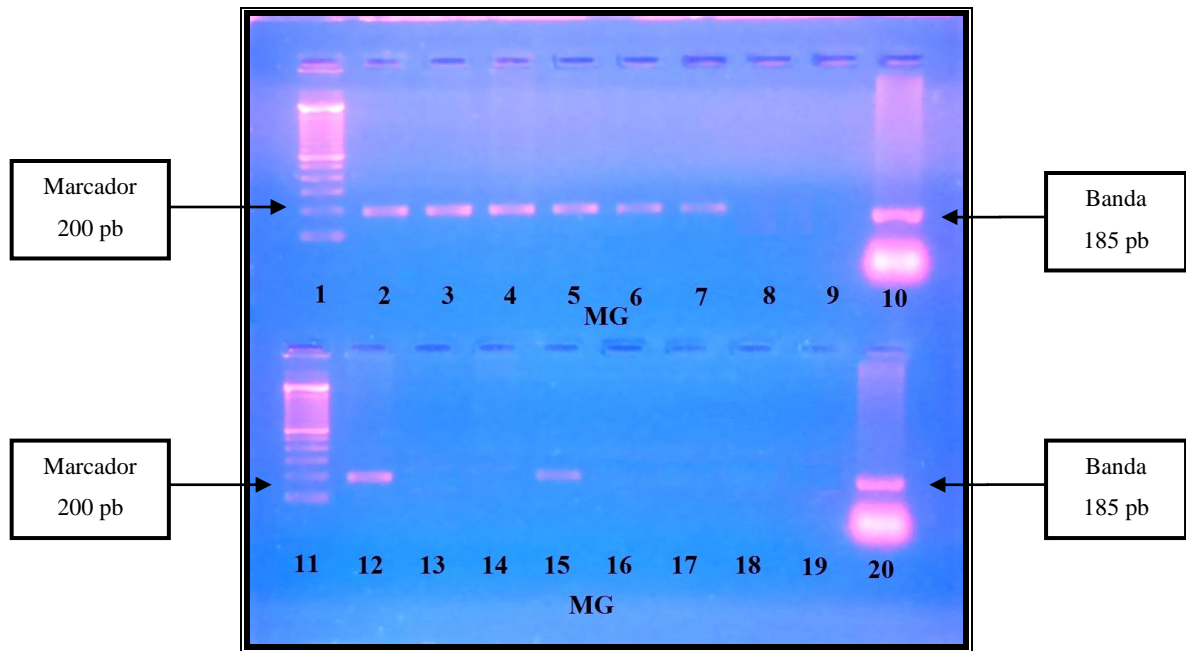


Figura Nro. 6: Reacción de la Polimerasa en Cadena para *Mycoplasma gallisepticum* de las muestras 36 – 50.

Fila superior: Carril n°1: Escala de 100 pb; Carril n°2: muestra 36 (Positiva); Carril n°3: muestra 37 (Positiva); Carril n°4: muestra 38 (Positiva); Carril n°5: muestra 39 (Positiva); Carril n°6: muestra 40 (Positiva); Carril n°7: muestra 41 (Positiva); Carril n°8: muestra 42; Carril n°9: Control Negativo; Carril n°10: Control Positivo *Mycoplasma gallisepticum* cepa A5969.

Fila inferior: Carril n°11: Escala de 100 pb; Carril n°12: muestra 43 (Positiva); Carril n°13: muestra 44; Carril n°14: muestra 45; Carril n°15: muestra 46 (Positiva); Carril n°16: muestra 47; Carril n°17: muestra 48; Carril n°18: muestra 49; Carril n°19: muestra 50; Carril n°20: Control Positivo *Mycoplasma gallisepticum* cepa A5969.

Anexo Nro. 2: Electroforesis en gel de agarosa al 2%, sometida al transiluminador Ultra Violeta. En las imágenes se muestran las bandas de los amplicones del fragmento del gen RNA ribosomal 16S de *Mycoplasma synoviae*, cuyo peso molecular es de 207 pb. Cada grupo de muestras de campo, son acompañados por sus correspondientes controles negativos y positivos.

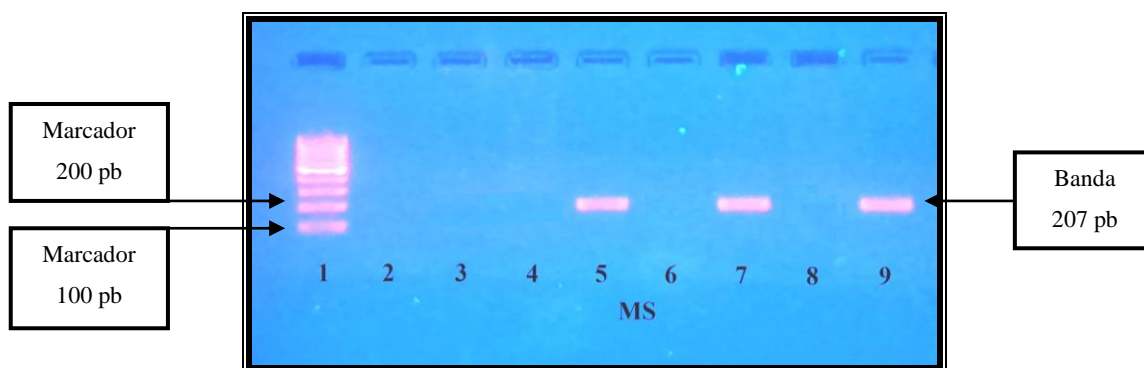


Figura Nro. 7: Reacción de la Polimerasa en Cadena para *Mycoplasma synoviae* de las muestras 1 – 6.

Carril n°1: Escala de 100 pb; Carril n°2: muestras 1; Carril n°3: muestra 2; Carril n°4: muestra 3; Carril n°5: muestra 4 (Positiva); Carril n°6: muestra 5; Carril n°7: muestra 6 (Positiva); Carril n°8: Control Negativo; Carril n°9: Control Positivo *Mycoplasma synoviae* cepa WVU1853.

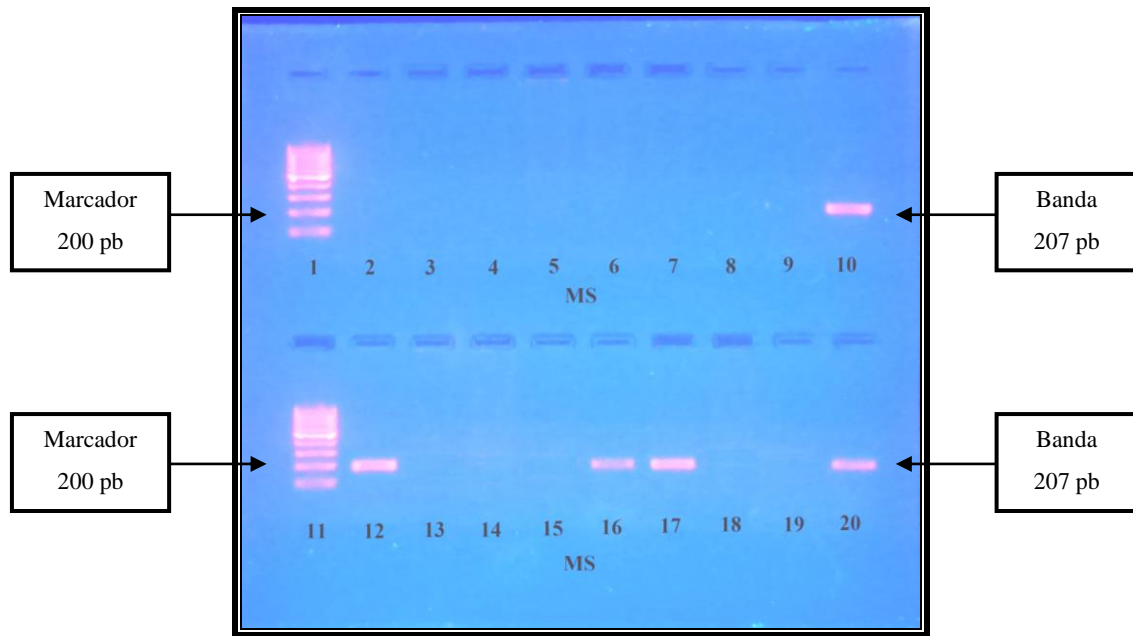


Figura Nro. 8: Reacción de la Polimerasa en Cadena para *Mycoplasma synoviae* de las muestras 7 – 20.

Fila superior: Carril n°1: Escala de 100 pb; Carril n°2: muestra 10; Carril n°3: muestra 11; Carril n°4: muestra 12; Carril n°5: muestra 13; Carril n°6: muestra 14; Carril n°7: muestra 15; Carril n°8: muestra 16; Carril n°9: Control Negativo; Carril n°10: Control Positivo *Mycoplasma synoviae* cepa WVU1853.

Fila inferior: Carril n°11: Escala de 100 pb; Carril n°12: muestra 17 (Positiva); Carril n°13: muestra 18; Carril n°14: muestra 19; Carril n°15: muestra 20; Carril n°16: muestra 7 (Positiva); Carril n°17: muestra 8 (Positiva); Carril n°18: muestra 9; Carril n°19: Control Negativo; Carril n°20: Control Positivo *Mycoplasma synoviae* cepa WVU1853.

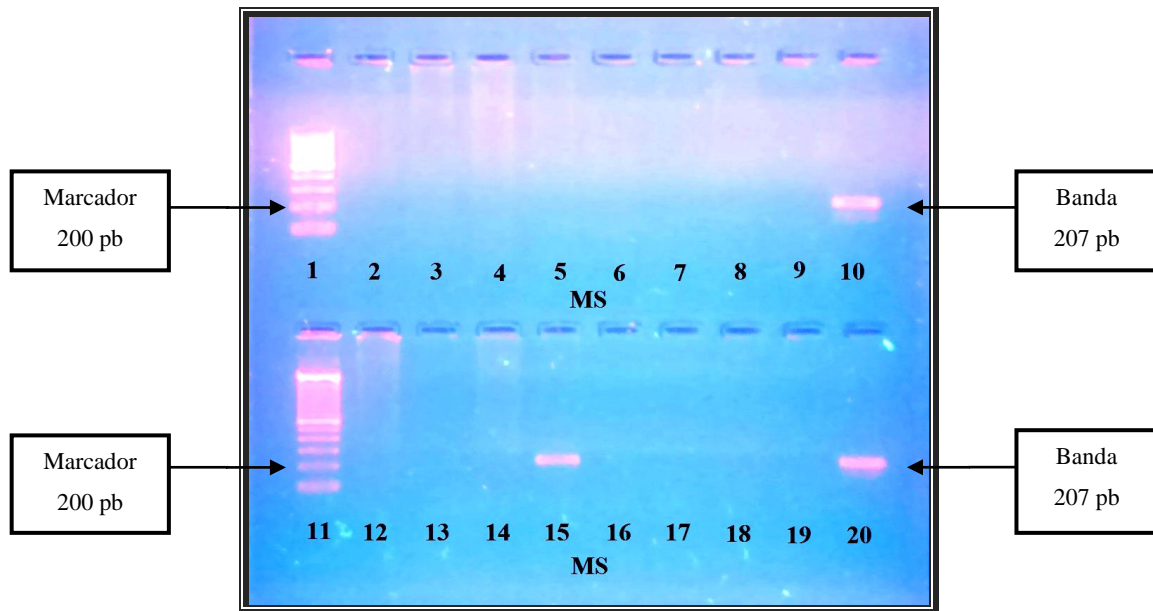


Figura Nro. 9: Reacción de la Polimerasa en Cadena para *Mycoplasma synoviae* de las muestras 21 – 35.

Fila superior: Carril n°1: Escala de 100 pb; Carril n°2: muestra 21; Carril n°3: muestra 22; Carril n°4: muestra 23; Carril n°5: muestra 24; Carril n°6: muestra 25; Carril n°7: muestra 26; Carril n°8: muestra 27; Carril n°9: Control Negativo; Carril n°10: Control Positivo *Mycoplasma synoviae* cepa WVU1853.

Fila inferior: Carril n°11: Escala de 100 pb; Carril n°12: muestra 28; Carril n°13: muestra 29; Carril n°14: muestra 30; Carril n°15: muestra 31 (Positiva); Carril n°16: muestra 32; Carril n°17: muestra 33; Carril n°18: muestra 34; Carril n°19: muestra 35; Carril n°20: Control Positivo *Mycoplasma synoviae* cepa WVU1853.

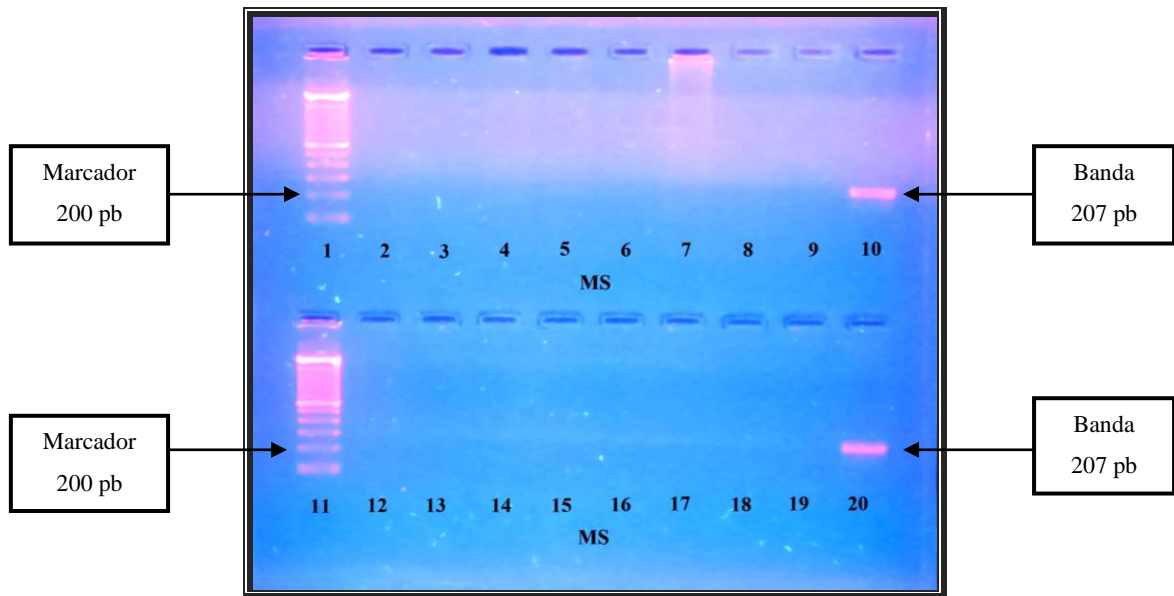


Figura Nro. 10: Reacción de la Polimerasa en Cadena para *Mycoplasma synoviae* de las muestras 36 – 50.

Fila superior: Carril n°1: Escala de 100 pb; Carril n°2: muestra 36; Carril n°3: muestra 37; Carril n°4: muestra 38; Carril n°5: muestra 39; Carril n°6: muestra 40; Carril n°7: muestra 41; Carril n°8: muestra 42; Carril n°9: Control Negativo; Carril n°10: Control Positivo *Mycoplasma synoviae* cepa WVU1853.

Fila inferior: Carril n°11: Escala de 100 pb; Carril n°12: muestra 43; Carril n°13: muestra 44; Carril n°14: muestra 45; Carril n°15: muestra 46; Carril n°16: muestra 47; Carril n°17: muestra 48; Carril n°18: muestra 49; Carril n°19: muestra 50; Carril n°20: Control Positivo *Mycoplasma synoviae* cepa WVU1853.