



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE *Mycoplasma gallisepticum* Y *Mycoplasma synoviae* EN UNA EMPRESA DE AVES DE POSTURA DE MÚLTIPLES EDADES

**FELIPE IGNACIO CASTILLO VERA**

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

PROFESOR GUÍA: HECTOR HIDALGO OLATE. M.V., M.Sc.

**SANTIAGO, CHILE**  
2014



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS**  
**ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**



DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE *Mycoplasma gallisepticum* Y *Mycoplasma synoviae* EN UNA EMPRESA DE AVES DE POSTURA DE MÚLTIPLES EDADES

**FELIPE IGNACIO CASTILLO VERA**

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

NOTA FINAL: .....

		NOTA	FIRMA
	PROFESORA GUÍA : DR. HÉCTOR HIDALGO OLATE	.....	.....
	PROFESOR CONSEJERO: DR. CLAUDIO ZÚÑIGA	.....	.....
	PROFESOR CONSEJERO: DR. CHRISTOPHER HAMILTON-WEST	.....	.....

**SANTIAGO, CHILE**  
 2014

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN</b> .....	<b>3</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>5</b>
1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS <i>MYCOPLASMA SPP</i> .....	5
2. GENERALIDADES DE LA INFECCIÓN POR <i>MYCOPLASMA GALLISEPTICUM</i> Y <i>MYCOPLASMA</i> <i>SYNOVIAE</i> .....	6
3. IMPACTO ECONÓMICO DE LA INFECCIÓN POR <i>MYCOPLASMA GALLISEPTICUM</i> Y <i>MYCOPLASMA</i> <i>SYNOVIAE</i> .....	7
4. FACTORES DE RIESGO PARA LA INFECCIÓN POR <i>MYCOPLASMA GALLISEPTICUM</i> Y <i>MYCOPLASMA</i> <i>SYNOVIAE</i> .....	8
5. VÍAS DE TRANSMISIÓN DE <i>MYCOPLASMA GALLISEPTICUM</i> Y <i>MYCOPLASMA</i> <i>SYNOVIAE</i> .....	9
6. PERÍODO DE INCUBACIÓN Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE <i>MYCOPLASMA GALLISEPTICUM</i> Y <i>MYCOPLASMA</i> <i>SYNOVIAE</i> .....	10
7. CONSECUENCIAS DE LA INFECCIÓN POR <i>MYCOPLASMA GALLISEPTICUM</i> Y <i>MYCOPLASMA</i> <i>SYNOVIAE</i> .....	11
8. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARA <i>MYCOPLASMA GALLISEPTICUM</i> Y <i>MYCOPLASMA</i> <i>SYNOVIAE</i> .....	12
9. MÉTODOS DE CONTROL DE LA INFECCIÓN POR <i>MYCOPLASMA GALLISEPTICUM</i> Y <i>MYCOPLASMA</i> <i>SYNOVIAE</i> .....	14
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>15</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>15</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>15</b>

<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
1.   ÁREA DE ESTUDIO .....	16
2.   BIOSEGURIDAD DEL PLANTEL AVÍCOLA .....	17
3.   MUESTRA.....	18
4.   PRUEBA DE DIAGNÓSTICO .....	18
5.   EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS .....	19
6.   PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS .....	19
7.   ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	19
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>21</b>
1.   RESULTADO GENERAL DE LA SEROPREVALENCIA DE <i>MYCOPLASMA GALLISEPTICUM</i> Y <i>MYCOPLASMA SYNOVIAE</i> EN EL PLANTEL AVÍCOLA. ....	21
2.   CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS POSITIVAS A <i>MYCOPLASMA GALLISEPTICUM</i> .....	22
3.   CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS POSITIVAS A <i>MYCOPLASMA SYNOVIAE</i> .....	28
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>33</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>36</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>37</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>43</b>
1.   INFORMACIÓN GENERAL DE LOS SECTORES PRODUCTIVOS DE GALLINAS DE POSTURA PERTENECIENTES AL PLANTEL AVÍCOLA ESTUDIADO.....	43
2.   MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS PARA LA REALIZACIÓN DE LA PRUEBA DE ELISA INDIRECTO PARA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA <i>MYCOPLASMA GALLISEPTICUM</i> , LABORATORIO BIOCHEK.....	44

## RESUMEN

Se recolectaron 453 muestras de suero de gallinas ponedoras pertenecientes a una empresa productora de huevos ubicada en la Región de Valparaíso, y se determinó la seroprevalencia de *Mycoplasma gallisepticum* (MG) y *Mycoplasma synoviae* (MS) a través de la detección de anticuerpos utilizando la prueba de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Las muestras se obtuvieron desde los 10 sectores con aves de diferentes edades pertenecientes a las 4 granjas que componen la empresa, y se evidenció que todos éstos presentaron individuos positivos a MG y/o MS. Del total de las 453 muestras de sueros, se observó que 239 (52,8%) eran positivas a MG, mientras que 322 (71,1%) eran positivas a MS. Los rangos de positividad fluctuaron entre un 6,7% y un 100% tanto para MG como para MS en los distintos sectores evaluados. Para ambos agentes se evaluaron diferencias en los factores grupo etario, tipo de galpón, granja y sector productivo. En el caso de MG, la granja Los Ceibos, los sectores Ceibo 1, Ceibo 2 y Ceibo 3, y los galpones abiertos, fueron los que mostraron una mayor cantidad de muestras positivas. Mientras que para MS, la granja Los Ceibos, los sectores Ceibo 1, Ceibo 3, Los Boldos y Los Espinos, los galpones abiertos y los grupos etarios de mediana y avanzada edad fueron los que mostraron una mayor cantidad de muestras positivas.

## SUMMARY

453 serum samples from laying hens belonging to an egg producer located in the Valparaíso region were collected to determine the seroprevalence of *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and *Mycoplasma synoviae* (MS) by using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The samples were obtained from 10 sectors of the company, which had birds of different ages belonging to the company 4 farms. It was shown that all these sectors have positive MG and / or MS birds. Of the total of 453 serum samples 239 (52.8%) were positive to MG, while 322 (71.1%) were positive to MS. The ranges of positivity ranged between 6.7% and 100% for both MG and MS in the different sectors evaluated. Differences in certain factors were evaluated for both agents: age, type of barn, farm and production sector. For MG, the farm Los Ceibos, the Ceibo 1 sector, Ceibo 2 sector, Ceibo 3 sector and open sheds showed a greater number of positive samples. For MS, the farm Los Ceibos, the Ceibo 1 sector, Ceibo 3 sector, Los Boldos sector, Los Espinos sector, open sheds and the age groups of middle and old age were

those who had a higher number of positive samples.

## INTRODUCCIÓN

La producción avícola nacional está compuesta por dos grandes subconjuntos, la producción de carne de ave y la producción de huevos de consumo.

El sistema de producción de huevos de consumo, objeto del presente estudio, se caracteriza por haber evolucionado desde pequeños productores a grandes empresas integradas verticalmente, con una producción intensiva y un gran desarrollo e inversión en tecnología en los procesos productivos, existiendo en Chile existe un total de 147 empresas productoras de huevos (Covacevic y Esnaola, 2010).

La producción industrial de huevos de consumo está representada por tres grupos. El primer grupo corresponde a 12 empresas, cada una de las cuales posee entre 400.000 y 1.500.000 aves de postura y generan alrededor del 60% de la producción nacional. El segundo grupo lo componen productores que poseen entre 100.000 y 350.000 gallinas de postura, mientras que el tercer grupo lo conforman productores que poseen menos de 100.000 gallinas de postura. Además, existe un sector informal de productores de huevos que poseen entre 500 y 5.000 aves de postura, y su producción es generalmente estacional o intermitente (Hidalgo, 2013<sup>1</sup>).

De acuerdo con datos de la Asociación de Productores de Huevos de Chile (ASOHUEVO), el año 2013 en Chile había alrededor de 12.500.000 gallinas de postura, y la producción de huevos alcanzó las 3.213.943.000 unidades/año (Anón, 2014).

La mantención de una adecuada situación sanitaria en la avicultura chilena se basa en la participación de instituciones públicas y privadas, cuya acción se concentra en la prevención de la llegada de agentes patógenos. Sin embargo hay patógenos que son endémicos y están presentes en las instalaciones de esta área productiva pudiendo afectar el crecimiento y el desarrollo de la industria.

---

<sup>1</sup> HIDALGO, H. 2013 [Comunicación Personal]. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias

Los *Mycoplasma spp.* son un ejemplo de patógenos presentes en las instalaciones avícolas de todo el mundo, tanto en la producción de carne como en la producción de huevos. No obstante esta realidad, y considerando que estos patógenos pueden transmitirse de manera vertical y horizontal entre los lotes de aves, además del hecho de que las aves infectadas permanecen como portadoras y potenciales diseminadoras de la infección de por vida, vale la pena mencionar que las medidas de prevención y control aplicadas en la industria de producción de carne de pollo y de pavo han sido tremendamente efectivas y permiten criar este tipo de aves en lotes libres de estas infecciones.

Muy distinta es la situación en la industria de gallinas ponedoras de huevos de consumo, donde principalmente el manejo de sistemas de múltiples edades provoca que aún cuando las pollitas lleguen libres de estas infecciones al comienzo de la postura, la presencia de aves de mayor edad portadoras, facilitará la diseminación entre las aves más jóvenes.

Los *Mycoplasma spp* que tienen importancia en la industria avícola son: *Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synoviae* (MS), *Mycoplasma meleagridis* (MM) y *Mycoplasma iowae* (MI). El presente estudio se enfoca en MG y MS debido a que son los que afectan y producen problemas en la industria de gallinas de postura (Kleven, 1998).

La prevención es el único método práctico para mantener las aves libres de estos patógenos y se basa en el conocimiento de la epidemiología de la enfermedad, siendo de gran importancia la determinación de su incidencia y prevalencia. Para lograr tener un registro de esta variable, el diagnóstico serológico es un instrumento útil y eficiente ya que permite evaluar el estatus sanitario de los lotes de aves, siendo la detección de anticuerpos particularmente útil para determinar la presencia o ausencia de diferentes patógenos en los planteles avícolas.

El objetivo del presente estudio es establecer la seroprevalencia de MG y de MS en una empresa productora de huevos de consumo con sistema de múltiples edades, para lo cual se utilizará la prueba de ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) para la detección de anticuerpos contra ambos patógenos en los sueros de las

aves pertenecientes a este plantel productivo.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1. Características generales de los *Mycoplasma spp*

Los *Mycoplasma spp.* son un grupo diverso de especies procariontes que pertenecen a la clase Mollicutes, Orden I, Mycoplasmatales, Género I, Mycoplasma, filogenéticamente relacionados a las eubacterias gram positivas. Son los organismos más pequeños conocidos que se autorepican (Athamna *et al.*, 1997). Son más de 120 especies diferentes que poseen un genoma pequeño de 600-1350 kb, requieren colesterol para su crecimiento y crecen óptimamente a una temperatura 37°C (Kleven, 1998). Otra característica relevante es que son organismos desprovistos de pared celular y están rodeados sólo por membrana plasmática, esto explica la tradicional morfología de “huevo frito” que presentan las colonias, la resistencia a los antibióticos que afectan la síntesis de la pared celular, la susceptibilidad a la mayoría de los desinfectantes comunes como el fenol y la formalina (Ley, 2008) y sus complejos requerimientos nutricionales (Razin, *et al.*, 1998). En general, los *Mycoplasmas* colonizan las superficies de las mucosas y la mayoría de las especies son no invasivas, aunque ahora se sabe que algunas especies, incluyendo a *Mycoplasma gallisepticum*, poseen la habilidad de penetrar células (Winner *et al.*, 2000).

Existen muchas especies de *Mycoplasmas* que infectan a varias especies de aves, y cuatro de estos organismos son reconocidos como patógenos de importancia para las aves comerciales: *Mycoplasma gallisepticum* (MG), causa enfermedad respiratoria y pérdidas en la producción de huevos en pollos, gallinas y pavos; *Mycoplasma synoviae* (MS), puede causar enfermedad respiratoria y/o sinovitis en pollos, gallinas y pavos; *Mycoplasma meleagridis* (MM), causa infección respiratoria y deformación de huesos y articulaciones en pavos; *Mycoplasma iowae* (MI), es la principal causa de mortalidad embrionaria en pavos.

De estos 4 patógenos, las gallinas de postura comercial se ven afectadas sólo por MG y MS (Kleven, 1998).

## 2. Generalidades de la infección por MG y MS

La infección por MG resulta en uno de los más importantes problemas de salud y toma de decisiones técnicas y económicas en la industria de la carne de ave (pollos broiler y pavos), así como en la producción de huevos (gallinas ponedoras). Está mundialmente distribuido y produce una enfermedad respiratoria de alta morbilidad en pollos, gallinas y pavos. En éstos últimos puede producir además un cuadro de sinusitis infecciosa (Kleven y Levisohn, 1996; Levisohn y Kleven, 2000). Este *Mycoplasma* es el más patógeno y económicamente significativo en la industria avícola, causando pérdidas económicas debido a disminución en la producción de huevos, deterioro en la eficiencia de conversión de alimentos, depreciación y decomiso de canales por aerosaculitis, y aumento de costos por medicación (Nascimento *et al.*, 2005; Ley, 2008).

Por su parte MS también afecta a las aves comerciales, está mundialmente distribuido y afecta con mayor frecuencia a planteles de postura comercial de múltiples edades (Kleven *et al.*, 2007; Opitz, 1983a). Produce enfermedad respiratoria, y en la industria mundial de producción de carne puede llevar a decomiso debido a aerosaculitis. Por otro lado, en las aves de postura comercial puede producir peritonitis y mortalidad, aunque las infecciones subclínicas del tracto respiratorio parecen ser predominantes (Feberwee *et al.*, 2009). En pollos y pavos la enfermedad se puede volver sistémica y termina en una sinovitis infecciosa que puede ser aguda o crónica, afectando principalmente la membrana sinovial de articulaciones y las vainas de los tendones, produciendo cuadros exudativos de sinovitis, tendovaginitis o bursitis (Kleven y Ferguson-Noel, 2008a).

### 3. Impacto económico de MG y MS

MG y MS son las infecciones por *Mycoplasmas* que más preocupan en las operaciones avícolas comerciales y pueden tener un gran impacto a nivel económico. Son infecciones muy difíciles de erradicar (Ewing *et al.*, 1996a).

Existen distintos autores que coinciden en que el rol patógeno de MG y las pérdidas económicas asociadas a esta infección son mayores que las producidas por MS (Evans *et al.*, 2009; Mohammed *et al.*, 1986; Mohammed *et al.*, 1987b).

Estudios realizados en Estados Unidos muestran que las pérdidas económicas pueden alcanzar entre 97 y 118 millones de dólares (Carpenter *et al.*, 1979; Johnson, 1983; Mohammed *et al.*, 1987a), esto principalmente debido al impacto de la infección por MG en la postura de huevos, la cual puede disminuir entre un 10% y un 20% (cerca de 16 huevos por gallina) (Tosi *et al.*, 2004).

Otro estudio estadounidense (Carpenter *et al.* 1981) demostró que el promedio de las pérdidas en la producción de huevos debido a la exposición natural a la infección por MG es de 15,7 huevos/gallina comparado con lotes de aves libres de esta infección, mientras que Mohammed *et al.* (1987a) demostró que los lotes de aves positivas a MG producen entre 5 y 12 huevos menos por gallina comparados con lotes no infectados. Además, los programas de control y prevención para MG que incluyen tratamientos, vacunación y bioseguridad son costos adicionales a considerar (Ley, 2008).

El impacto de MS sobre la postura de huevos está menos estudiado y hay distintos datos. Mientras existen reportes estadounidenses en los que no se observó un impacto significativo en la producción de huevos (Mohammed *et al.*, 1987a), existen otras investigaciones realizadas en ese mismo país, en las que se evidenció que los lotes infectados con MS pueden producir 10 huevos menos por gallina comparado con los lotes no infectados (Mallinson, 1985). Otro estudio realizado en Australia (Morrow *et al.*, 1990) demostró una pérdida acumulativa de un 10% en la producción de huevos en los lotes infectados con MS.

#### **4. Factores de riesgo para la infección con MG y MS**

Existen muchos factores que se relacionan con una mayor probabilidad de infección ya sea con MG, MS o ambos. Entre los factores más importantes que se pueden mencionar se encuentran:

a) Manejo en sistemas de múltiples edades. Las aves infectadas permanecerán como portadoras pudiendo infectar a las aves más jóvenes que entran al lote de producción (Kleven *et al.*, 2007; Mohammed *et al.*, 1986).

b) Distancia entre granjas o sectores productivos. Está demostrado que la diseminación de ambos patógenos entre distintas instalaciones es posible en distancias de hasta dos kilómetros (Kleven, 2008b).

c) Tiempo de sobrevivencia de ambos patógenos fuera del huésped. Va desde 24 horas a cuatro días para MG, y entre 12 horas a tres días para MS, este tiempo suficiente para que se pueda producir contagio de estos patógenos (Christensen *et al.*, 1994).

d) Aumento de los contactos con humanos y movimiento de maquinaria entre granjas o sectores. Constituye un riesgo de transporte mecánico de la infección (Mohammed *et al.*, 1987b).

e) Presencia de animales silvestres. Pueden ser portadores biológicos y/o mecánicos de la infección (Mohammed *et al.*, 1987b).

f) Falta de ventilación para disminuir el amonio y el polvo en los galpones. Ambos producen daño en el epitelio respiratorio pudiendo facilitar la infección por uno o ambos patógenos (Mohammed *et al.*, 1987b).

## 5. Vías de transmisión de MG y MS

Tanto MG como MS pueden transmitirse desde las reproductoras a la descendencia por vía vertical (*in ovo* / transovárica), y de ave a ave por vía horizontal (contacto directo o indirecto). Cualquiera sea la vía de contagio, las aves serán portadoras de por vida y podrán diseminar la infección en cualquier momento.

La transmisión vertical es una característica de gran relevancia, ya que mediante este mecanismo la infección se perpetúa en las poblaciones avícolas. La progenie de las reproductoras portadoras nacerá contaminada e infectará a las aves susceptibles, ya sea en el proceso de la incubación, en el nacimiento, en el período de crianza y recría, o bien en la etapa de postura. Mediante todas estas vías de contagio, la infección se irá diseminando entre los lotes de aves comerciales (Nascimento *et al.*, 2005; Bradbury, s.f.).

En el caso de MG, se ha demostrado que la transmisión vertical ocurre en los huevos puestos por gallinas infectadas de forma natural y experimental. Estudios de Glisson y Kleven (1985), y de Sasipreeyajan *et al.* (1987), demuestran que el *peak* de transmisión a través del huevo después del desafío con MG ocurre entre la tercera y la sexta semana, afectando entre el 25% y el 50% de los huevos. En el caso de MS esta transmisión también ocurre ya sea bajo condiciones naturales o experimentales, y cuando un lote se infecta durante la postura de huevos, el rango de transmisión a través del huevo parece ser mayor durante las primeras 4-6 semanas después de la infección (Kleven y Ferguson-Noel, 2008a).

Por su parte, la transmisión horizontal de MG y MS ocurre fácilmente por contacto directo o indirecto entre aves contaminadas y aves no contaminadas, y la diseminación puede llegar a afectar al 100% de las aves susceptibles (McMartin *et al.*, 1987). Probablemente el contagio es por vía aérea y los microorganismos son excretados a través del tracto respiratorio de las aves portadoras, diseminándose mediante aerosoles e infectando a las aves susceptibles a través del tracto respiratorio superior y/o la conjuntiva ocular (Bradbury y Levisohn, 1996; Ley, 2008). Autores describen que la transmisión horizontal es más rápida en el caso de MS, aunque las causas no están del todo claras (Kleven y Ferguson-Noel, 2008a; Bradbury, s.f.).

## 6. Período de incubación y manifestaciones clínicas de MG y MS

La infección por MG tiene un período de incubación variable, siendo el rango típico entre seis y 21 días. Los signos clínicos son altamente variables y dependen del hospedero, de la virulencia de la cepa, de la presencia de infecciones concomitantes y también de la existencia de factores estresantes (Ferguson-Noel, *s.f.*; Dingfelder *et al.*, 1991).

Los signos clínicos en aves de postura y en pollos broiler incluyen estertores respiratorios, tos, descargas nasales y oculares, disminución en el consumo de alimento y en la producción de huevos, pérdida de peso, y disminución de la incubabilidad de los huevos fértiles. En pavos lo más común es que se presente un cuadro de sinusitis (Nascimento *et al.*, 2005).

Entre las lesiones post mortem se puede observar la presencia de exudado catarral en el aparato respiratorio alto, neumonía fibrinosa, aerosaculitis caseosa, perihepatitis y pericarditis generalmente por contaminación secundaria con *Escherichia coli* (Ferguson-Noel, *s.f.*). Además, se describe la aparición en un pequeño porcentaje de casos de queratoconjuntivitis con edema en el tejido subcutáneo facial y en los párpados, con opacidad ocasional de la córnea (Nunoya *et al.*, 1995).

En el caso de MS, el periodo de incubación que sigue a la exposición al agente, es generalmente de 11 a 21 días, dependiendo de la virulencia de la cepa, factores estresantes y de la presencia de otras infecciones (Kleven y Ferguson-Noel, 2008a).

Los signos respiratorios incluyen tos, estertores y estornudos. Además este agente puede provocar cojera, retraso en el crecimiento, palidez de cabeza y cresta, e hinchazón de articulaciones de la pata y del pie (Nascimento *et al.*, 2005).

Entre las lesiones post mortem observables se incluyen engrosamiento y opacidad de los sacos aéreos, articulaciones inflamadas con exudado viscoso, exudado subcutáneo caseoso y exudado caseoso en las patas (Lockaby *et al.*, 1998).

## 7. Consecuencias de la infección por MG y MS

La infección de un lote de aves con *Mycoplasmas* patógenos puede provocar, entre otros efectos adversos, la potenciación de otras enfermedades especialmente del tipo respiratorias, reacciones post vacuna exacerbadas, incremento de la susceptibilidad a infecciones bacterianas secundarias, deterioro de parámetros zootécnicos, menor peso, mayor mortalidad, decomiso de aves de descarte durante la faena e incremento de los costos de producción por el uso de productos terapéuticos (Vásquez, 2010).

Una de las consecuencias más graves de la contaminación de los lotes con *Mycoplasmas* es la potenciación de cuadros producidos por otros agentes. Es así como la interacción de los *Mycoplasmas* con el virus de Newcastle o con el virus de la Bronquitis infecciosa resulta en un efecto sinérgico en la patología provocada por estos agentes. La mayoría de estas interacciones también se describen con el uso de cepas vacunales vivas, ya sea del virus de Newcastle o del virus de la Bronquitis infecciosa (Kleven, 1998).

Interacciones de tres agentes, ya sea, *Mycoplasmas*, Enfermedad de Newcastle, Bronquitis infecciosa o *Escherichia coli*, resultan siempre en una enfermedad más grave que cuando se combinan sólo dos de estos (Kleven, 1998).

Otros agentes que interactúan con los *Mycoplasmas* son: *Haemophilus paragallinarum*, el virus de la Laringotraqueitis infecciosa, Adenovirus y Reovirus (Kleven, 1998).

## 8. Métodos de diagnóstico para MG y MS

Para determinar la presencia o ausencia de *Mycoplasmas* en los planteles, los métodos de diagnóstico son esenciales. Estos métodos se pueden dividir en dos grupos, los métodos directos (que identifican al agente) como son el cultivo bacteriano, y diferentes métodos moleculares como por ejemplo la técnica de reacción de la polimerasa en cadena (PCR), y los métodos indirectos (aquellos que demuestran una respuesta serológica contra el agente) entre los que están la aglutinación rápida en placa (ARP), la inhibición de la hemoaglutinación (IH) y la prueba de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Kleven y Hofacre, 2006; Feberwee *et al.*, 2005).

Los métodos serológicos son útiles en el monitoreo de lotes de aves en los programas de control de MG y MS y para ayudar en el diagnóstico cuando se sospecha de una infección (Anón, 2006a).

La prueba de ARP es rápida, de bajo costo y de alta sensibilidad. Ha sido ampliamente utilizada como método de *screening* inicial en el monitoreo de los lotes de aves y el serodiagnóstico (Kleven y Levisohn, 1996). Sin embargo, reacciones no específicas ocurren en algunos lotes infectados ya sea con MG o MS debido a reacciones cruzadas de los antígenos (Avakian y Kleven, 1990; Ben Abdelmoumen y Roy, 1995). También pueden aparecer reacciones inespecíficas en lotes de aves recientemente inmunizadas con vacunas oleosas contra otras enfermedades (Glisson *et al.*, 1984; Yoder, 1989).

La prueba de ELISA fue desarrollada para aumentar la eficiencia de los test y para mejorar la sensibilidad y la especificidad de los resultados obtenidos con la prueba de ARP, aún así reacciones no específicas pueden ocurrir, pero este inconveniente ha sido mejorado a través de la purificación de los antígenos utilizados en la prueba (Kleven y Hofacre, 2006).

La prueba de IH ha sido utilizada comúnmente para confirmar las reacciones positivas en la ARP debido a su mayor especificidad (Kleven *et al.*, 1988). También se ha utilizado para este fin en muestras positivas a la prueba de ELISA.

Resultados de distintas experiencias comparando métodos diagnósticos establecen que la prueba de ELISA es levemente menos sensible que la prueba de ARP, pero es mucho más específica que ésta. Además se ha demostrado que la prueba de ELISA es levemente menos específica que la IH, pero es mucho más sensible que esta última (Avakian *et al.*, 1988; Ewing *et al.*, 1996b; Kempf *et al.*, 1994). Otro estudio (Talkington *et al.*, 1985) indica que tanto la prueba de ELISA como la prueba de IH poseen un alto grado de especificidad.

Feberwee *et al.* (2005) concluyen, luego de analizar el rendimiento del cultivo, PCR, ARP, IH y la prueba de ELISA, que un buen diagnóstico se basa en el uso de un conjunto de herramientas de monitoreo, además de la signología clínica presente en las aves.

En resumen el test de ELISA es una prueba que posee una gran sensibilidad y especificidad, que puede ser utilizada como una prueba serológica primaria en el diagnóstico de los *Mycoplasmas* (Ewing *et al.*, 1996a; Opitz *et al.*, 1983b).

## 9. Métodos de control de la infección por MG y MS

El control de estos patógenos se realiza mediante 3 estrategias generales: prevención de la infección, medicación, y vacunación.

A nivel mundial, la mantención de lotes libres de *Mycoplasmas* patógenos consiste en obtener pollitos broilers, pavitos y pollitas de reemplazo de un día de edad desde fuentes libres de esta infección, y mantener este estatus de animales libres entre los reproductores y su progenie (Rodríguez y Abad, s.f), utilizar el sistema de manejo *all in-all out* (broilers y pavos), y mantener buenas medidas de bioseguridad además de un efectivo sistema de monitoreo. Esto ha sido posible de alcanzar en la industria de pollos y pavos (Ewing *et al.*, 1996a), pero en el caso de los planteles comerciales de gallinas de postura con sistema de múltiples edades, aún cuando las pollitas de un día de edad nazcan libres de la infección por MG y MS, la transmisión horizontal hace que la mantención de los lotes de aves libres de MG y MS sea muy difícil (Levisohn y Kleven, 2000; Kleven, 2008c).

Una adecuada terapia antimicrobiana puede ser muy útil en la prevención de los signos y lesiones clínicas, así como para reducir las pérdidas económicas (Ley, 2008), pero no puede ser utilizado para eliminar la infección de los lotes, y no es una herramienta satisfactoria en el largo plazo. Algunos ejemplos de antibióticos utilizados para el control de los *Mycoplasmas* son: quinolonas, tiamulina, tilosina, lincomicina, espectinomicina y tetraciclinas (Vásquez, 2010).

La vacunación contra MG o MS puede ser una útil solución a largo plazo en situaciones donde la mantención de lotes libres de la infección sea imposible, especialmente en producciones de postura de huevos de múltiples edades. Las opciones incluyen vacunas inactivadas, bacterinas oleosas, vacunas vivas y vacunas recombinantes (Kleven, 2008b).

En Chile, siguiendo la tendencia mundial, el control y prevención de la infección por MG y MS han sido exitosos en la industria de la producción de carne y se mantienen abuelas, reproductoras, pollos y pavos de engorda libres de estos *Mycoplasmas*. En cambio, en la industria de producción de huevos, la existencia de planteles con múltiples

edades, permite la presencia de MG y MS según información no documentada (Hidalgo, 2013<sup>2</sup>).

## **HIPÓTESIS**

Existe infección por *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* en las gallinas ponedoras pertenecientes a la empresa estudiada. Los niveles de seropositividad serán mayores en las aves pertenecientes al grupo etario de mayor edad.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la seroprevalencia de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* en una empresa de gallinas ponedoras de múltiples edades.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar la seroprevalencia de la infección por *Mycoplasma gallisepticum* en la población de gallinas en producción en una empresa de gallinas de postura.
2. Determinar la seroprevalencia de la infección por *Mycoplasma synoviae* en la población de gallinas en producción en una empresa de gallinas de postura.
3. Establecer el momento productivo en que aparecen las primeras evidencias serológicas de infección por *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* en las gallinas de una empresa de gallinas de postura.
4. Relacionar la prevalencia de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* con la ubicación geográfica y edades de las gallinas en producción entre los distintos sectores de la empresa.

---

<sup>2</sup> HIDALGO, H. 2013 [Comunicación Personal]. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **1. Área de estudio**

Las muestras de suero que se utilizarán en este estudio serán obtenidas desde las gallinas ponedoras pertenecientes a una empresa productora comercial de huevos de consumo con ubicación en la región de Valparaíso, Chile.

El total de aves en producción que conforman el plantel es de alrededor de 650.000 gallinas. Las aves están distribuidas en cuatro predios denominados granjas (Los Copihues, Los Ceibos, Los Boldos y Los Molles), y dentro de ellas existen diferentes áreas productivas denominadas sectores. Cada sector aloja entre 35.000 y 180.000 aves, distribuidas en galpones que alojan grupos de gallinas de edades similares, las que entran y salen de cada sector al mismo tiempo (Anexo N°1).

La granja Los Copihues aloja a aves que están en la etapa de crecimiento (no están en producción), mientras que las otras granjas (Los Ceibos, Los Boldos y Los Molles) alojan gallinas de diferentes edades que ya están en etapa productiva.

La granja Los Ceibos está compuesta por los sectores Ceibo 1, Ceibo 2, Ceibo 3, Ceibo 4 y Los Ceibos; la granja Los Boldos está compuesta por los sectores Los Quillayes, Los Boldos y Los Espinos; mientras que la granja Los Molles contiene solamente un sector llamado Los Molles.

Las granjas con aves en producción se encuentran separadas por distancias de entre uno y cinco kilómetros, mientras que la granja Los Copihues (que aloja aves en proceso de crianza y recría) se encuentra separada del resto por una distancia de unos 10 kilómetros. Por otro lado, la distancia que existe entre los sectores productivos dentro de cada granja varía entre 250 metros y un kilómetro.

Existen galpones abiertos hacia el exterior con jaulas convencionales y galpones cerrados de ambiente controlado con jaulas automatizadas. Además existe un tercer tipo de galpón que corresponde a galpones abiertos de crianza en piso, utilizados para alojar a las pollitas en su etapa de crecimiento (antes del inicio de la postura).

Los galpones abiertos con jaulas convencionales (Gab) corresponden a un sistema de producción antiguo (tradicional). Se compone de pabellones de madera con jaulas dispuestas en forma de pirámide, alojando cada una entre tres y cuatro aves en postura. El sistema de alimentación y de recolección de huevos es manual, mientras que la entrega de agua puede ser a través de una canaleta de flujo continuo, o a través de bebederos tipo nipple. El guano se acumula bajo el primer piso de jaulas y se elimina una o dos veces por ciclo productivo. Con respecto a la ventilación y la temperatura, éstas se manejan mediante un sistema de cortinas laterales, las que se abren o cierran dependiendo de las condiciones ambientales. Este sistema no permite un completo control sobre estos aspectos. Por sus características, este tipo de galpón permite la aparición de varios factores de riesgo descritos para la infección por MG y/o MS, como por ejemplo el contacto con humanos y la presencia de animales silvestres.

Por otro lado los galpones cerrados de ambiente controlado con jaulas automatizadas (Gcaut), son parte de un sistema de producción moderno. Su estructura es metálica y las jaulas están dispuestas una encima de otra, alojando cada una entre 10 y 12 aves en producción y formando estructuras de hasta seis pisos. El sistema de alimentación es automático y la recolección de huevos se realiza diariamente mediante cintas transportadoras también automáticas. La entrega de agua se realiza exclusivamente mediante bebederos de tipo nipple, mientras que la recolección de guano se realiza de manera automática mediante una correa sin fin. Este tipo de galpones también posee sistema de cortinas laterales, y además cuenta con extractores de aire, facilitando el control de la ventilación y la temperatura.

## **2. Bioseguridad del plantel avícola**

La empresa cuenta con medidas de bioseguridad generales. En todas las granjas el ingreso está restringido para personas y vehículos. Los camiones y otros vehículos que ingresan deben ser desinfectados mediante un arco sanitario (rodiluvio) o mediante aspersión con motobomba de una solución desinfectante. El personal que ingresa a una granja debe vestir ropa de trabajo (*overall* y botas) que son entregadas por la empresa y pasar por un pediluvio con solución desinfectante. Además antes de entrar a cualquier pabellón, se debe pasar nuevamente por un pediluvio. En el caso de la granja Los Copihues, adicionalmente las personas que ingresan deben tomar una ducha sanitaria antes de ingresar al recinto. Por otro lado, el personal que trabaja en un sector productivo

tiene prohibición de visitar otros sectores. Además están implementadas otras medidas como existencia de cerco perimetral, registro de visitas, prohibición a trabajadores de tener aves, mallas laterales en los galpones, desinfección de galpones, control de plagas, manejo del agua de bebida, manejo de aves muertas y manejo del guano de acuerdo a un acuerdo de producción limpia (APL) suscrito con el consejo de producción limpia.

### **3. Muestras**

Las muestras a utilizar en este estudio corresponden a muestras de sangre de las gallinas, desde las cuales se obtendrá el suero para la realización de la prueba diagnóstica. Serán recolectadas en todos los sectores que conforman la empresa y de manera aleatoria desde los galpones que pertenecen a cada sector productivo.

Según Nieves (2010), al no existir estudios similares en aves de postura se puede utilizar una prevalencia referencial de 0.5, con esto el tamaño de la muestra corresponde a 385 sueros, los que se deben distribuir en el total de sectores a evaluar. Basado en esto, y para maximizar la utilización del material diagnóstico disponible, el n se estableció en 453 (n=453) y se distribuyó de manera igualitaria en 7 de los 10 sectores que componen la empresa (45 muestras cada sector). Mientras que en el sector Los Copihues se obtuvo 48 muestras y en el Ceibo 144 muestras.

La población de aves del estudio corresponde a pollitas y gallinas ponedoras de huevos de consumo entre 13 y 82 semanas de edad, pertenecientes a la raza White Leghorn.

### **4. Test de diagnóstico**

Para evaluar la presencia de anticuerpos contra MG y MS se utilizará la prueba de ELISA empleando un kit comercial (Laboratorio Biocheck®). Los materiales a utilizar en la prueba de ELISA, corresponden a los especificados por el fabricante del kit diagnóstico (ANEXO 2).

## **5. Extracción de las muestras**

Las muestras de sangre que se utilizaron se obtuvieron desde la vena alar, con jeringas de 3 ml y agujas de 21G. Se utilizó alcohol al 70% con tintura de yodo como antiséptico en el área de punción de la vena.

Luego de la obtención de la muestra de sangre, esta fue vaciada en tubos estériles de vidrio que fueron mantenidos a temperatura ambiente y en posición inclinada para promover una mayor retracción de los coágulos, y por ende una mayor liberación de suero. Los tubos que contenían los sueros se trasladaron al Laboratorio de Patología Aviaria de la Universidad de Chile donde se realizó la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos contra MG y contra MS.

## **6. Procesamiento de las muestras**

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Patología Aviaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, ubicado en avenida Santa Rosa 11735, La Pintana, Santiago, Chile.

Una vez llegadas las muestras, el suero de cada tubo fue vaciado en tubos eppendorf y se sometió a centrifugación a 593 g (centrífuga Mirko 20, Laboratorio Hettich) durante 15 minutos para separar células sanguíneas del suero. Luego de la centrifugación la muestra se traspasó a nuevos tubos eppendorf, los cuales se mantuvieron bajo congelación a -20 °C hasta el momento de la realización de la prueba diagnóstica. Los procedimientos de la prueba de ELISA correspondieron a los especificados por el fabricante del kit diagnóstico (ANEXO 2).

## **7. Análisis de los resultados**

Los resultados de la prueba de ELISA son entregados en planillas elaboradas por el programa computacional BioChek2010® de laboratorio BioChek®. Para que el ensayo sea válido la absorbancia media del control negativo debe estar por bajo del 0,3 y la diferencia entre el control medio negativo y el control medio positivo debería ser superior a 0,15. La concentración relativa de anticuerpos en la muestra se determina a través del cálculo del cociente de la absorbancia de la muestra con respecto a la del control positivo (S/P).

Las muestras de suero que tengan cocientes S/P inferiores a 0,50 deben considerarse negativas. Las muestras con cocientes S/P iguales o superiores a 0,50 (títulos superiores a 668) deben considerarse positivas e indican que ha habido inmunización u otro tipo de exposición a MG/MS.

Primero se realizó una prueba de correlación de Pearson utilizando el programa estadístico Infostat® entre la edad de las aves y los títulos de anticuerpos hallados contra MG y MS. Para esto las aves fueron clasificadas en tres grupos etarios, el grupo A está compuesto por aves desde la semana 13 a la semana 37, el B por aves entre las semanas 44 y 76, y el grupo C por aves de 77 a 82 semanas.

Luego, para analizar posibles diferencias entre las muestras positivas se usó la prueba T de Student para comparación de proporciones, utilizándose el programa estadístico Epi info®.

Se evaluaron diferencias entre:

- a- Grupo etario (grupo A, grupo B, grupo C).
- b- Tipo de galpón en que las aves están alojadas (piso, Gab, Gcaut).
- c- Granja (Los Copihues\*, Los Ceibos, Los Boldos, Los Molles\*).
- d- Sectores productivos pertenecientes a la granja Los Ceibos (Ceibo 1, Ceibo 2, Ceibo 3, Ceibo 4, Los Ceibos).
- e- Sectores productivos pertenecientes a la granja Los Boldos (Los Quillayes, Los Espinos, Los Boldos).

\*La granja Los Copihues y la granja Los Molles no admiten comparaciones de sectores ya que se componen sólo por uno de éstos.

Para la prueba de comparación de proporciones se estableció si existían diferencias estadísticas entre el total de los elementos pertenecientes a cada análisis con un  $\alpha = 0,05$ .

## RESULTADOS<sup>3</sup>

### 1. Resultado general de la seroprevalencia de *Mycoplasma gallisepticum* (MG) y *Mycoplasma synoviae* (MS) en el plantel avícola

En el presente estudio se obtuvieron muestras positivas a MG y/o MS en todas las granjas analizadas. Los resultados muestran que un total de 239 (52,8%) de los sueros analizados resultaron positivos a la infección por MG, mientras que 322 (71,1%) de los sueros resultaron positivos a la infección por MS (Tabla N°1).

Tabla N°1. Resultados generales de seropositividad contra MG y MS en sueros de aves mediante la prueba de ELISA.

<b>Bacteria</b>	<b>Cantidad de Sueros Analizados</b>	<b>Muestras Positivas</b>	<b>Muestras Negativas</b>	<b>Porcentaje de Positividad (%)</b>
<b>MG</b>	453	239	214	52,8 <sup>a</sup>
<b>MS</b>	453	322	131	71,1 <sup>b</sup>

---

<sup>3</sup> Los análisis tanto para MG como para MS referentes a infección global, por granja, por sector productivo y por tipo de galpón, no consideran las diferencias de edad existente entre las aves.

## 2. Características de las muestras positivas a MG

El análisis de los sueros que resultaron positivos mostró una asociación positiva, aunque de baja intensidad (0,31), entre los títulos de anticuerpos contra MG y la edad de las aves (Tabla N°2).

Tabla N°2. Correlación de Pearson para el logaritmo de los títulos de anticuerpos contra MG y MS en los sueros analizados y la edad de las aves.

Probabilidades Coeficientes	Log Anticuerpo Contra MG	Log Anticuerpo Contra MS	Edad (semanas)
Log Anticuerpo Contra MG	1,00	4,4E-05	6,9E-12
Log Anticuerpo Contra MS	0,19	1,00	0,00
Edad (semanas)	0,31	0,65	1,00

El análisis de los resultados mostró que existieron diferencias significativas en la proporción de muestras positivas a MG respecto a los factores: granja, sector productivo y tipo de galpón.

Con respecto al análisis de los grupos etarios (Tabla N°3) no se observaron diferencias significativas en la proporción de muestras positivas a MG.

Tabla N°3. Seropositividad contra MG en sueros de aves mediante la prueba de ELISA por grupo etario.

<b>Bacteria</b>	<b>Grupo Etario</b>	<b>Edad (semanas)</b>	<b>Muestras Positivas/Número Muestras</b>	<b>Porcentaje Positividad (%)</b>
<b>MG</b>	A	13-37	62/139	44,6
	B	44-76	83/180	46,1
	C	77-82	94/134	70,1

Al observar los resultados de las muestras positivas a MG en las diferentes granjas (Tabla N°4), se encontraron diferencias significativas en la comparación de la granja Los Boldos respecto a las granjas Los Ceibos y Los Molles, y en la comparación de la granja Los Copihues con la granja Los Ceibos. La mayor proporción de muestras positivas se encontró en la granja Los Ceibos (70,5%). Por otro lado la menor proporción de muestras positivas (25,7%) se obtuvo en la granja Los Boldos.

Tabla N°4. Seropositividad contra MG en sueros de aves mediante la prueba de ELISA por granja productiva.

<b>Bacteria</b>	<b>Granja</b>	<b>Muestras Positivas /Número Muestras</b>	<b>Porcentaje Positividad (%)</b>
<b>MG</b>	Los Boldos	35/136	25,7 <sup>a</sup>
	Los Copihues	20/48	41,7 <sup>ab</sup>
	Los Molles	25/45	55,6 <sup>bc</sup>
	Los Ceibos	158/224	70,5 <sup>c</sup>

El análisis para MG de los sectores que componen la granja Los Ceibos (Tabla N°5), mostró que hubo diferencias significativas en la proporción de muestras positivas al comparar los sectores Ceibo 1, Ceibo 2 y Ceibo 3 respecto a los sectores Ceibo 4 y Los Ceibos. Por otro lado el sector Ceibo 4 presentó diferencias significativas respecto al sector Los Ceibos. Se observó que la mayor proporción de muestras positivas estaban presentes en los sectores Ceibo 1 (95,5%), Ceibo 2 (100%) y Ceibo 3 (100%), mientras que la menor proporción de muestras positivas perteneció al sector Los Ceibos (6,7%).

Tabla N°5. Seropositividad contra MG en sueros de aves mediante la prueba de ELISA en los sectores productivos de la granja Los Ceibos.

<b>Sector Productivo</b>	<b>Ceibo 1</b>	<b>Ceibo 2</b>	<b>Ceibo 3</b>	<b>Ceibo 4</b>	<b>Los Ceibos</b>
<b>Bacteria</b>	MG	MG	MG	MG	MG
<b>Muestras Positivas/Número Muestras</b>	42/44	45/45	45/45	24/45	3/45
<b>Positividad (%)</b>	95,5 <sup>c</sup>	100 <sup>c</sup>	100 <sup>c</sup>	53,3 <sup>b</sup>	6,7 <sup>a</sup>

No existieron diferencias significativas en el análisis de los sectores productivos dentro de la granja Los Boldos para las muestras positivas a MG (Tabla N°6).

Tabla N°6. Seropositividad contra MG en sueros de aves mediante la prueba de ELISA en los sectores productivos de la granja Los Boldos.

<b>Sector Productivo</b>	<b>Los Quillayes</b>	<b>Los Boldos</b>	<b>Los Espinos</b>
<b>Bacteria</b>	MG	MG	MG
<b>Muestras Positivas/Número Muestras</b>	17/46	11/45	7/45
<b>Positividad (%)</b>	37	24,4	15,6

Al comparar los resultados positivos a MG entre los diferentes tipos de galpones (Tabla N°7), se evidenció que las aves alojadas en galpones abiertos con jaulas convencionales presentaron una mayor proporción de muestras positivas (64,9%) que aquellas alojadas en crianza en piso (41,7%) y en galpones cerrados con ambiente controlado (23,6%).

Tabla N°7. Seropositividad contra MG en sueros de aves mediante la prueba de ELISA por tipo de galpón en que alojan las aves.

<b>Bacteria</b>	<b>Tipo de Galpón</b>	<b>Muestras Positivas/Número Muestras</b>	<b>Porcentaje Positividad (%)</b>
<b>MG</b>	Cerrado con ambiente controlado	25/106	23,6 <sup>a</sup>
	Crianza Piso	20/48	41,7 <sup>a</sup>
	Abierto con jaula convencional	194/299	64,9 <sup>b</sup>

### 3. Características de las muestras positivas a MS

El análisis de los sueros que resultaron positivos mostró una asociación positiva, aunque de mediana intensidad (0,65) entre los títulos de anticuerpos contra MS y la edad de las aves (Tabla N°2).

Existieron diferencias significativas en la proporción de muestras positivas a MS respecto a los factores grupo etario, granja, sector productivo y tipo de galpón.

Al observar los resultados respecto a los grupos etarios para MS (Tabla N°8), existió diferencia significativa en la comparación del grupo A respecto de los grupos B y C. La menor proporción de muestras positivas (36,7%) se encontró en el grupo A (13-37 semanas). Mientras que la mayor proporción de muestras positivas (80,6% y 94%) se encontró en los grupos B y C respectivamente.

Tabla N°8. Seropositividad contra MS en sueros de aves mediante la prueba de ELISA por grupo etario.

<b>Bacteria</b>	<b>Grupo Etario</b>	<b>Edad (semanas)</b>	<b>Muestras Positivas/Número Muestras</b>	<b>Porcentaje Positividad (%)</b>
<b>MS</b>	A	13-37	51/139	36,7 <sup>a</sup>
	B	44-76	145/180	80,6 <sup>b</sup>
	C	77-82	126/134	94 <sup>b</sup>

Los resultados de la comparación de las muestras positivas a MS entre granjas (Tabla N°9), mostró diferencias significativas en la comparación de la granja Los Copihues

respecto todas las otras. Además existieron diferencias significativas entre las granjas Los Ceibos y Los Molles. La mayor proporción de muestras positivas a MS (83%) se encontró en la granja Los Ceibos, mientras que la menor proporción se evidenció en la granja Los Copihues (6,7%).

Tabla N°9. Seropositividad contra MS en sueros de aves mediante la prueba de ELISA por granja productiva.

<b>Bacteria</b>	<b>Granja</b>	<b>Muestras Positivas/Número Muestras</b>	<b>Porcentaje Positividad (%)</b>
<b>MS</b>	Los Copihues	3/45	6,7 <sup>a</sup>
	Los Molles	27/45	60 <sup>b</sup>
	Los Boldos	106/136	77,9 <sup>bc</sup>
	Los Ceibos	186/224	83 <sup>c</sup>

Al revisar los resultados entre los sectores que componen la granja Los Ceibos para las muestras positivas a MS (Tabla N°10), se observó que hubo diferencias significativas en la comparación del sector Los Ceibos con respecto al los sectores Ceibo 1 y Ceibo 3. La mayor proporción de muestras positivas a MS se halló en los sectores Ceibo 1 (93,2%) y Ceibo 3 (93,3), mientras que la menor proporción de muestras positivas (64,4%) se encontró en el sector Los Ceibos.

Tabla N°10. Seropositividad contra MS en sueros de aves mediante la prueba de ELISA en los sectores productivos de la granja Los Ceibos.

<b>Sector Productivo</b>	<b>Ceibo 1</b>	<b>Ceibo 2</b>	<b>Ceibo 3</b>	<b>Ceibo 4</b>	<b>Los Ceibos</b>
<b>Bacteria</b>	MS	MS	MS	MS	MS
<b>Muestras Positivas/Número Muestras</b>	41/44	40/45	42/45	34/45	29/45
<b>Positividad (%)</b>	93,2 <sup>b</sup>	88,9 <sup>ab</sup>	93,3 <sup>b</sup>	75,6 <sup>ab</sup>	64,4 <sup>a</sup>

En el caso de los sectores que componen la granja Los Boldos (Tabla N°11), existieron diferencias significativas en la proporción de muestras positivas a MS en la comparación del sector Los Quillayes, con respecto a los sectores Los Boldos y Los Espinos. La mayor proporción de muestras positivas se presentó en los sectores Los Boldos (88,9%) y Los Espinos (100%), mientras que la menor proporción de muestras positivas (45,7%) estuvo en el sector Los Quillayes.

Tabla N°11. Seropositividad contra MS en sueros de aves mediante la prueba de ELISA en los sectores productivos de la granja Los Boldos.

<b>Sector Productivo</b>	<b>Los Quillayes</b>	<b>Los Boldos</b>	<b>Los Espinos</b>
<b>Bacteria</b>	MS	MS	MS
<b>Muestras Positivas/Número Muestras</b>	21/46	40/45	45/45
<b>Positividad (%)</b>	45,7 <sup>a</sup>	88,9 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>

En la comparación de las muestras positivas a MS en relación al tipo de galpón que aloja a las aves también hubo diferencias significativas (Tabla N°12). Se demostró que las aves alojadas en galpones abiertos con jaulas convencionales presentaron la mayor proporción de muestras positivas (84,9%), mientras que la crianza en piso mostró la menor proporción de muestras positivas (6,7%).

Tabla N°12. Seropositividad contra MS en sueros de aves mediante la prueba de ELISA por tipo de galpón en que aloja las aves.

<b>Bacteria</b>	<b>Tipo de Galpón</b>	<b>Muestras Positivas/Número Muestras</b>	<b>Porcentaje Positividad (%)</b>
<b>MS</b>	Crianza Piso	3/45	6,7 <sup>a</sup>
	Cerrado con ambiente controlado	65/106	61,3 <sup>b</sup>
	Abierto con jaula convencional	254/299	84,9 <sup>c</sup>

## DISCUSIÓN

El objetivo del presente estudio fue la determinación de la seroprevalencia de *Mycoplasma gallisepticum* (MG) y *Mycoplasma synoviae* (MS) en un plantel comercial de gallinas de postura con sistema de granjas de edades múltiples. Esta es la primera vez en Chile que se realiza un estudio acerca de estos patógenos en este tipo de sistema productivo abarcando la totalidad de una empresa.

La importancia de estos patógenos en la avicultura mundial está bien documentada y deja de manifiesto el importante rol patógeno de estas infecciones (Kleven y Levisohn, 1996; Levisohn y Kleven, 2000; Opitz, 1983a). MG y MS son patógenos de especial importancia en los planteles avícolas de gallinas de postura, en los cuales pueden presentar altas prevalencias y pueden causar problemas productivos y económicos, siendo extremadamente difíciles de erradicar (Ewing *et al.*, 1996a).

Las prevalencias encontradas en el presente estudio para MG (52,8%) y para MS (71,1%) demuestran que la infección por ambos patógenos está presente en la instalación avícola productora de huevos evaluada. Además se evidenció que están altamente diseminadas, existiendo muestras positivas en todos los sectores productivos estudiados.

En un estudio de Mohammed *et al.* (1986) en California del Sur, se estudiaron 360 sectores con aves ponedoras comerciales, observando prevalencias de un 69% para MG y de 87% para MS. Estos resultados coinciden con los encontrados en el presente estudio, evidenciando altas prevalencias de ambos patógenos.

Como ya se mencionó, el plantel avícola estudiado posee sistema de granjas de edades múltiples. Este tipo de sistema productivo es el principal factor de riesgo en la presentación tanto de MG como de MS. Además, una vez que estos patógenos entran en este tipo de sistema productivo son extremadamente difíciles de erradicar (Mohammed *et al.*, 1986; Mohammed *et al.*, 1987; Ewing *et al.*, 1996a).

Si bien cada sector productivo dentro de una misma granja funciona como una unidad con sistema *all in-all out*, la aparición de muestras positivas en todos éstos puede deberse a distintos factores, entre los más importantes se encuentran la transmisión horizontal, el contacto con aves positivas, la cercanía entre sectores en producción y que las medidas de bioseguridad sean aplicadas sin la suficiente rigurosidad.

Respecto a la cercanía con otros sectores productivos, Kleven (2008b) describe que la diseminación y transmisión por vía aérea de los Mycoplasmas puede ocurrir en distancias de hasta dos kilómetros. En el plantel estudiado, si bien las granjas con aves en producción se encuentran a distancias de entre uno y cinco kilómetros, dentro de cada granja los diferentes sectores con aves no se encuentran a distancias mayores a 1 kilómetro. Este hecho, y apoyado en los resultados obtenidos, coincide con el estudio mencionado y sugiere que la distancia geográfica existente entre las instalaciones productivas es un factor de riesgo que favorecería la infección por diferentes patógenos. La granja Los Copihues es la única cuya distancia escapa a esta situación ya que se encuentra a 10 kilómetros de cualquier otra instalación con aves. La aparición de muestras positivas en ella se discutirá más adelante.

La edad como factor de riesgo para la aparición de muestras positivas a MG y/o MS se evidencia en dos investigaciones donde se observó que en las aves ponedoras de mayor edad se presenta una mayor cantidad de muestras positivas (Mohammed *et al.*, 1986; Mohammed *et al.*, 1987b). Esto coincide con los resultados de la presente investigación para MS, no así en el caso de MG donde la infección detectada en las aves más jóvenes no permite que se repita esta tendencia.

No obstante, es importante señalar que de todas maneras se evidenció una asociación positiva entre la edad de las aves y los títulos de anticuerpos hallados en los sueros tanto para MG como para MS. Además en el caso de MS, se evidenció una mayor proporción de muestras positivas en las aves de mayor edad (grupo B y C) coincidiendo con la literatura. Por otro lado, en el caso de MG, el presente estudio no pudo determinar diferencias estadísticas en la prevalencia de acuerdo a los grupos etarios, aunque vale la pena mencionar que en el análisis si se observó una tendencia que coincidía con la encontrada en el caso de MS y en la literatura, pero que no alcanzó a apreciarse de manera estadística.

Se evidenció una mayor proporción de muestras positivas en los galpones abiertos que poseen ventilación natural. Este tipo de galpones poseen una serie de características que coinciden con factores de riesgo que pueden facilitar el desafío por parte de ambos patógenos y la posible transmisión de éstos. Entre las características más importantes se encuentra una mayor mano de obra, la presencia de aves silvestres y roedores. Por otro lado los galpones cerrados con ambiente controlado disminuyen drásticamente el ingreso

de aves silvestres debido a sus características estructurales, reduciendo así la posibilidad de desafío por parte de patógenos y la diseminación de éstos. Este punto además indica que la implementación de tecnología puede ser útil en la prevención y control de diferentes enfermedades, y en este caso particular de MG y MS.

Si bien el hecho de que aparecieran muestras positivas a ambas infecciones en todos los sectores que alojan aves en producción no es extraño por las razones ya discutidas, la aparición de muestras positivas en las aves más jóvenes que están en período de crianza (granja Los Copihues), es inesperado y de especial cuidado debido a las posibles causas (donde la más preocupante es la posible existencia de infección en el plantel de reproductoras) y consecuencias de la existencia de muestras positivas en estas aves que aún no entran a la producción.

A pesar de no ser un objetivo del presente estudio, vale la pena comentar a la industria avícola que si bien la prevalencia para ambos patógenos fue alta, esta no se relacionó con bajas de postura, las que si son descritas por distintos autores para MG (Carpenter et al., 1979; Johnson, 1983; Mohammed et al., 1987a), y MS (Mallinson, 1985; Morrow et al., 1990).

La estrategia nacional de prevención y control contra MG y MS centra en la bioseguridad, previniendo la infección de las aves reproductoras (evitando la transmisión vertical) y reduciendo el riesgo de la diseminación horizontal de MG y MS. Las medidas de bioseguridad generales utilizadas para prevenir la infección y diseminación de diferentes patógenos son planteadas por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) para su aplicación en los diferentes planteles avícolas nacionales (Anón, 2006 b,c). Sin embargo, a pesar de que la mayoría de estas medidas preventivas se encuentran aplicadas en la empresa evaluada en este estudio, la infección por ambos patógenos se encuentra presente en todas las granjas estudiadas, planteando la necesidad de revisar la rigurosidad con que éstas medidas son aplicadas.

## **CONCLUSIONES**

Los resultados de este estudio corroboran la alta diseminación y prevalencia que presentan MG y MS en planteles avícolas de gallinas de postura de múltiples edades.

La positividad a MG y MS puede comenzar a una edad temprana de las aves, y se va incrementando a medida que aumenta la edad de éstas.

Las medidas de bioseguridad rutinarias del plantel no son suficientes para evitar la diseminación de MG y MS entre diferentes sectores y granjas.

Es deseable una mayor cantidad de estudios que abarquen la totalidad de las granjas y sectores que componen los planteles avícolas nacionales.

## BIBLIOGRAFÍA

- **ANÓN.;** 2006a. National poultry improvement plan. [en línea]. <<http://www.aphis.usda.gov/vs/npip/>> [consulta: 15-08-2012].
- **ANÓN.;** 2006b. Bioseguridad en planteles de ponedoras comerciales de huevos. [en línea]. <[http://www.asohuevo.cl/asociados/MP\\_3\\_BIOSEGURIDAD\\_AVES\\_PONEDORAS.pdf](http://www.asohuevo.cl/asociados/MP_3_BIOSEGURIDAD_AVES_PONEDORAS.pdf)> [consulta: 14-11-2012].
- **ANÓN.;** 2006c. Bioseguridad en plantas de incubación para aves de carne y ponedoras de huevos comerciales. [en línea]. <[http://www.asohuevo.cl/asociados/MP\\_4\\_BIOSEGURIDAD\\_AVES\\_INCUBACION\\_PONEDORAS.pdf](http://www.asohuevo.cl/asociados/MP_4_BIOSEGURIDAD_AVES_INCUBACION_PONEDORAS.pdf)> [consulta: 14-11-2012].
- **ANÓN.:** 2014. Resumen Producción. [en línea]. <<http://www.asohuevo.cl/asociados/industria/produccion.php>> [consulta: 10-05-2014].
- **ATHAMNA, A.; ROSENGARTEN, R.; LEVISOHN, S.; KAHANE, I.; YOGEV, D.;** 1997. Adherence of *Mycoplasma gallisepticum* involves variable surface membrane proteins. *Infect. Immun.* 65; 2468-2471.
- **AVAKIAN, A. P.; KLEVEN, S. H.; GLISSON, J. R.;** 1988. Evaluation of the specificity and sensitivity of two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits, the serum plate agglutination test, and the hemagglutination-inhibition test for antibodies formed in response to *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.* 32; 262–272.
- **AVAKIAN, A. P.; KLEVEN, S. H.;** 1990. The humoral immune response of chickens to *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* studied by immunoblotting. *Vet. Microbiol.* 24; 155–169.
- **BEN ABDELMOUMEN, B.; ROY, R. S.;** 1995. Antigenic relatedness between seven avian *mycoplasma* species as revealed by Western blot analysis. *Avian Dis.* 39; 250–262.
- **BRADBURY, J.M.;** s.f. Micoplasmas aviare: situación epidemiológica actual, bioseguridad y diagnóstico. [en línea]. [http://www.wpsa-aeca.es/aeca\\_imgs\\_docs/01\\_02\\_42\\_micoplasmas.pdf](http://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/01_02_42_micoplasmas.pdf) [consulta: 18-12-2012].

- **BRADBURY, J. M.; LEVISOHN, S.;** 1996. Experimental infections in poultry. **In:** J. G. Tully Molecular and diagnostic procedures in Mycoplasmaology. Volume II— Diagnostic Procedures, San Diego, CA: Academic Press. 361-370.
  
- **CARPENTER, T. E.; MILLER, K. F.; GENTRY, R. F.; SCHWARTZ, L. D.; MALLINSON, E. T.;** 1979. Control of *Mycoplasma gallisepticum* in commercial laying chickens using artificial exposure to Connecticut F strain *Mycoplasma gallisepticum*. Proceedings of the United States Animal Health Association. 83; 364-370.
  
- **CARPENTER, T. E.; MALLINSON, E. T.; MILLER, K. F.; GENTRY, R. F.; SCHWARTZ, L. D.;** 1981. Vaccination with F strain *Mycoplasma gallisepticum* to reduce production losses in layer chickens. Avian Dis. 25; 404-409.
  
- **CHRISTENSEN, N. H.; YAVARI, C. A.; MCBAIN, A. J.; BRADBURY, J.M.;** 1994. Investigations into the survival of *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma iowae* on materials found in the poultry house environment. Avian Pathol. 23; 127–143.
  
- **COVACEVIC, G.; ESNAOLA, V.;** 2010. Producción de huevos. [en línea]. [http://www.colegioveterinario.cl/adjuntosNoticias/informe\\_huevos\\_odepa.pdf](http://www.colegioveterinario.cl/adjuntosNoticias/informe_huevos_odepa.pdf) [consulta: 13-03-2013].
  
- **DINGFELDER, R. S.; LEY D. H.; MCLAREN, J. M.; BROWNIE, C.;** 1991. Experimental infection of turkeys with *Mycoplasma gallisepticum* of low virulence, transmissibility, and immunogenicity. Avian Dis. 35; 910–919.
  
- **EVANS, J.D.; THORNTON, D.L.; BRANTON, S.L.;** 2009. Diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* from a broiler breeder flock: Comparison of three diagnostics methods. Int. J. Poult. Sci. 8; 104-107.
  
- **EWING M. L.; LAUERMAN L. H.; KLEVEN S. H.; BROWN M. B.;** 1996a. Evaluation of diagnostic procedures to detect *Mycoplasma synoviae* in commercial multiplier-breeder farms and commercial hatcheries in Florida. Avian Dis. 40; 798-806.
  
- **EWING, M. L.; KLEVEN, S. H.; BROWN, M. B.;** 1996b. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and hemagglutination- inhibition for detection of antibody to *Mycoplasma gallisepticum* in commercial broiler, fair and exhibition, and experimentally infected birds. Avian Dis. 40; 13–22.

- **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; 260-268.
  
- **FEBERWEE, A.; MORROW, C. J.; GHORASHI, S. A.; NOORMOHAMMADI, A. H.; LANDMAN, W. J. M.;** 2009. Effect of a live *Mycoplasma synoviae* vaccine on the production of eggshell apex abnormalities induced by a *M. synoviae* infection preceded by an infection with *Infectious bronchitis virus* D1466. *Avian Pathol.* 38; 5; 333-340.
  
- **FERGUSON-NOEL, N.;** s.f. Atlas of avian diseases [en línea]. <<http://partnersah.vet.cornell.edu/avian-atlas/search/disease>> [consulta: 11-08-2012].
  
- **GLISSON, J. R.; DAWE, J. F.; KLEVEN, S. H.** 1984. The effect of oil-emulsion vaccines on the occurrence of nonspecific plate agglutination reactions for *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae*. *Avian Dis.* 28; 397–405.
  
- **GLISSON, J. R.; KLEVEN, S. H.;** 1985. *Mycoplasma gallisepticum* vaccination: further studies on egg transmission and egg production. *Avian Dis.* 29; 408–415.
  
- **JOHNSON, D. C.;** 1983. Role of management and sanitation in controlling *mycoplasma* outbreaks. *Avian Dis.* 27; 342-343.
  
- **KEMPF, I.; GESBERT, F.; GUITTET, M.; BENNEJEAN, G.; STIPKOVITS, L.;** 1994. Evaluation of two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* antibodies. *Avian Pathol.* 23; 329–338.
  
- **KLEVEN, S. H.; MORROW, C. J.; WHITHEAR, K. G.;** 1988. Comparison of *Mycoplasma gallisepticum* strains by hemagglutination-inhibition and restriction endonuclease analysis. *Avian Dis.* 32; 731–741.
  
- **KLEVEN, S. H.; LEVISOHN, S.;** 1996. *Mycoplasma* infections of poultry. **In:** J. G. Tully Molecular and diagnostic procedures in Mycoplasma. Volume II—Diagnostic Procedures, New York: Academic Press, Inc. 283–292.
  
- **KLEVEN, S. H.;** 1998. *Mycoplasmas* in the Etiology of Multifactorial Respiratory Disease. *Poultry Sci.* 77; 1146-1149.

- **KLEVEN, S. H.; HOFACRE, C. J.;** 2006. Current implications in the field of MG and MS on broilers and laying hen production. *The Poultry Informed Professional*. 90; 1-10.
  
- **KLEVEN, S. H.; RAVIV, Z.; FERGUSON-NOEL, N.; LAIBINIS, V.; WOOTEN, R.;** 2007. Role of *Mycoplasma synoviae* in commercial layer *Escherichia coli* peritonitis syndrome. *Avian Dis.* 51: 685-690.
  
- **KLEVEN S. H.; FERGUSON-NOEL N.** 2008a. *Mycoplasma synoviae* Infection. **In:** Saif Y. M. *et al.*, (Eds.) *Diseases of Poultry*. 12th edn. Blackwell Publishing Professional, 2121 State Avenue, Ames, Iowa 50014, USA, 845-856.
  
- **KLEVEN, S. H.;** 2008b. *Mycoplasma* infections in poultry. *International Animal Health News*. 31; 1-5.
  
- **KLEVEN, S. H.;** 2008c. Control of avian *mycoplasma* infections in commercial poultry. *Avian Dis.* 52; 367–374.
  
- **LEVISOHN, S.; KLEVEN, S. H.;** 2000. Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*). *Rev. Sci. Tech.* 19; 425–442.
  
- **LEY, D. H.** 2008. *Mycoplasma gallisepticum* Infection. **In:** Saif Y. M. *et al.*, (Eds.) *Diseases of Poultry*. 12th edn. Blackwell Publishing Professional, 2121 State Avenue, Ames, Iowa 50014, USA, 807-834.
  
- **LOCKABY, S. B.; HOERR, F. J.; LAUERMAN, L. H.; KLEVEN, S. H.;** 1998. Pathogenicity of *Mycoplasma synoviae* in broiler chickens. *Vet. Pathol.* 35; 178-190.
  
- **MALLINSON E. T.;** 1985. MS erodes profit margins. *Poult. Dig.* 44; 204-207.
  
- **MCMARTIN, D. A.; KHAN, M. I.; FARVER, T.B.; CHRISTIEC, G.;** 1987. Delineation of the lateral spread of *Mycoplasma gallisepticum* Infection in chickens. *Avian Dis.* 31; 814-819.
  
- **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; 519-526.

- **MOHAMMED, H. O.; CARPENTER, T. E.; YAMAMOTO, R.** 1987a. Economic impact of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* in commercial layer flocks. Avian Dis. 31; 477–482.
- **MOHAMMED, H. O.; CARPENTER, T. E.; YAMAMOTO, R.;** 1987b. Evaluation of factors associated with infection of commercial layers with *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae*. Avian Dis. 31; 70-476.
- **MORROW, C.J.; BELL, I.G.; WALKER, S.B.; MARKHAM, P.F.; THORP, B.H.; WHITHEAR, K.G.;** 1990. Isolation of *Mycoplasma synoviae* from infectious synovitis of chickens. Aust. Vet. J. 67; 121-124.
- **NASCIMENTO, E. R.; PEREIRA, V. L. A.; NASCIMENTO, M. G. F.; BARRETO, M. L.;** 2005. Avian *Mycoplasmosis* Update. Revista brasileira de ciencia avícola. 7; 1; 1-9.
- **NIEVES, M.; ICOCHEA, E.; GONZÁLES, R.; FALCÓN, N.;** 2010. Seroprevalencia de *Mycoplasma synoviae* en pavos reproductores criados en la zona de Lima, Perú. Rev. investig. vet. Perú. 21; 232-234.
- **NUNOYA, T.; YAGIHASHI, T.; TAJIMA, M.; NAGASAWA, Y.** 1995. Occurrence of keratoconjunctivitis apparently caused by *Mycoplasma gallisepticum* in layer chickens. Vet. Pathol. 32; 11–18.
- **OPITZ, H. M.;** 1983a. *Mycoplasma synoviae* infection in Maine's egg farms. Avian Dis. 27; 324–326.
- **OPITZ, H. M.; DUPLESSIS, J. B.; CYR, M. J.;** 1983b. Indirect micro enzyme linked immunosorbent assay ELISA for the detection of antibodies to *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum*. Avian Dis. 27; 773–786.
- **RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y.;** 1998. Molecular biology and pathogenicity of *mycoplasmas*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62; 1094-1156.
- **RODRÍGUEZ, M. J.; ABAD, J. C.;** s.f. Detección de *Mycoplasmas* de aves mediante ELISA-PCR. [en línea]. <[http://www.wpsa-aeca.es/articulo.php?id\\_articulo=58](http://www.wpsa-aeca.es/articulo.php?id_articulo=58)> [consulta: 23-07-2012].

- **SASIPREEYAJAN, J.; HALVORSON, D. A.; NEWMAN, J. A.;** 1987. Effect of *Mycoplasma gallisepticum* bacterin on egg-transmission and egg production. Avian Dis. 31; 776–781.
  
- **TALKINGTON, F. D.; KLEVEN, S. H.; BROWN, J.;** 1985. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* in experimentally infected chickens. Avian Dis. 29; 53-70.
  
- **TOSI, G.; LEONELLI, R.; TAMBA, M.; CALABRESE, R.;** 2004. Evaluation of an egg yolk enzyme-linked immunosorbent assay antibody test and its use to assess the prevalence of *Mycoplasma gallisepticum* infection in laying hens in Italy. XLIII Congreso de la Sociedad Italiana de Patología Aviar.
  
- **VÁSQUEZ, C.;** 2010. *Mycoplasma Gallisepticum* y la metafilaxia antimicoplasma. [en línea]. <<http://www.engormix.com/MA-avicultura/sanidad/articulos/micoplasma-gallisepticum-metafilaxia-antimicoplasma-t3033/165-p0.htm>> [consulta: 10-08-2012].
  
- **WINNER, F.; ROSENGARTEN, R.; CITTI, C.;** 2000. In vitro cell invasión of *Mycoplasma Galiisepticum*. Infect. Immun. 68; 4238-4244.
  
- **YODER, H. W., JR.;** 1989. Nonspecific reactions to *Mycoplasma* serum plate antigens induced by inactivated poultry disease vaccines. Avian Dis. 33; 60–68.

Anexo 1. Información general de sectores productivos de gallinas ponedoras pertenecientes al plantel avícola estudiado

Sector Productivo	Número de Galpones	Tipo de Galpón	Número total aproximado de aves en producción por sector
Los Ceibos	3	Ambiente Controlado	150.000
Ceibo 1	2	Abierto	35.000
Ceibo 2	3	Abierto	35.000
Ceibo 3	6	Abierto	70.000
Ceibo 4	6	Abierto	70.000
Los Boldos	2	Abierto	80.000
Los Espinos	6	Abierto/Ambiente Controlado	80.000
Los Molles	3	Abierto	100.000
Los Quillayes	2	Ambiente Controlado	80.000
Los Copihues*	24	Crianza Piso	180.000

\* Esta última granja aloja pollitas de reposición en la etapa de crecimiento, siendo estas aves aún improductivas. El resto de las granjas tiene un emplazamiento geográfico diferente y alojan a gallinas en producción de diferentes edades. La distancia que existe entre los sectores productivos dentro de cada granja varía entre 100 metros y un kilómetro.

Anexo 2. Materiales y procedimientos para la realización de la prueba de ELISA indirecto para detección de anticuerpos contra *Mycoplasma gallisepticum*\*, Laboratorio Biochek®

Materiales:

- Placas tapizadas con antígeno *Mycoplasma gallisepticum*.
- Un frasco de suero control positivo *Mycoplasma gallisepticum* – anti *Mycoplasma gallisepticum* de pollo en tampón fosfato con estabilizadores proteicos y conservado en azida de sodio.
- Un frasco de suero control negativo – suero de pollo diluido, no reactivo en anti-*Mycoplasma gallisepticum*, conservado en azida de sodio.
- Un frasco de anticuerpo conjugado anti-pollo: Alcalino-fosfatasa en buffer Tris con estabilizadores proteicos, rojo disperso (red dye) inerte y azida de sodio.
- Comprimidos de sustrato: Tableta de p-nitrofenilfosfato (PNPP) para disolver en tampón de sustrato.
- Un frasco de diluyente de la muestra, solución tampón, con azida de sodio.
- Tampón sustrato. Buffer de dietanolamina con co-factores enzimáticos.
- Un frasco de solución de frenado (Hidróxido sódico en tampón de dietanolamina).
- Tampón de lavado. Buffer fosfato salino en polvo y Tween.
- Gradillas para tubos de 12x75mm.
- Pipetas parciales de 1, 2, y 5 ml.
- Micropipeta monocanal ajustable 10-100 microlitros (µl).
- Micropipeta monocanal ajustable 1-10 µl.
- Micropipeta multicanal de ocho y 12 canales. (50 a 300 µl)
- Puntas amarillas desechables.
- Reloj control.

-Refrigerador (4-8°C).

-Termómetro para refrigerador contrastado con termómetro patrón.

-Espectrofotómetro (Tecan, sunrise) (405 nanómetros).

-Sistema de calefacción o enfriamiento para mantener la temperatura ambiental entre 18-25°C.

-Termómetro para medir temperatura ambiental contrastado con termómetro patrón.

-Agua destilada o desionizada.

Procedimientos preparación del reactivo substrato cromógeno y buffer de lavado:

Reactivo substrato. Añadir un comprimido tableta a 5,5-6 ml de reactivo substrato y agitar durante 10 minutos o hasta que se disuelva totalmente.

Buffer de lavado. Vaciar el contenido del sobre de tampón de lavado en un litro de agua destilada o desionizada y dejar bajo agitación para facilitar su completa disolución.

Procedimientos preparación de las muestras:

Se debe diluir las muestras en 1:500 con el diluyente de muestras antes de realizar el análisis (diluir 1µl de la muestra con 499µl de diluyente).

Procedimientos de la prueba:

Dejar que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (22°-27°C) y luego agítelos suavemente por inversión y con un movimiento circular.

Ordenar la placa (o placas) tapizadas con antígeno y anote la posición de las muestras en una hoja de trabajo.

Agregar 100µl de suero control negativo no diluido en los pocillos A1 y B1.

Agregar 100µl de suero control positivo no diluido en los pocillos C1 y D1.

Agregar 100µl de muestra diluida en los pocillos correspondientes.

Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Lavar cada pocillo de tres a cinco veces con unos 350µl de agua desionizada o destilada.

Añadir 100µl de anticuerpo conjugado en cada pocillo.

Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente (22°-27°C).

Lavar cada pocillo de tres a cinco veces con unos 350µl de agua desionizada o destilada.

Agregar 100µl de la solución de sustrato en cada pocillo.

Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente (22°-27°C).

Añadir 100µl de la solución de frenado en cada pocillo para detener la reacción.

Calibrar el lector del espectrofotómetro en blanco con aire.

Medir y anotar la densidad óptica a 405nm. A (405).

\*Para el caso de la prueba contra *Mycoplasma Synoviae* los materiales y procedimientos se repiten, cambiando solamente el antígeno de la prueba, el control positivo, el control negativo y el comprimido de sustrato.