

**DETECCIÓN Y DIFERENCIACIÓN
DE *Mycoplasma gallisepticum* Y *Mycoplasma synoviae*
MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR A PARTIR
DE HISOPOS TRAQUEALES DE AVES
CON SÍNTOMAS RESPIRATORIOS**

**Detection and Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum*
and *Mycoplasma synoviae* by PCR from Tracheal Swabs from Birds
with Respiratory Symptoms**

CESAR E. VENTURA¹, M.V.; GLORIA RAMÍREZ², Ph. D.;
VÍCTOR VERA³, Ph. D.

¹ Estudiante de Maestría. Grupo de Microbiología y Epidemiología,
Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. Facultad de
Medicina Veterinaria, Departamento de Salud Animal, Laboratorio
de Virología, Universidad Nacional de Colombia, Tel.: 316 50 00,
ext. 19469. ceventurap@unal.edu.co

² Grupo de Microbiología y Epidemiología, Universidad Nacional
de Colombia, Bogotá, Colombia. ggramirez@unal.edu.co

³ Grupo de Microbiología y Epidemiología, Universidad Nacional
de Colombia, Bogotá, Colombia. vjveraa@unal.edu.co

Correspondencia: ceventurap@unal.edu.co

Presentado el 14 de junio de 2012, aceptado el 12 de octubre de 2012, correcciones el 26 de octubre de 2012.

RESUMEN

Los micoplasmas son importantes patógenos en las aves por ser responsables de cuadros respiratorios que ocasionan grandes pérdidas económicas a la industria avícola alrededor del mundo. Existen principalmente dos especies de micoplasmas como causantes de enfermedad en aves comerciales, el *Mycoplasma gallisepticum* (MG) y el *Mycoplasma synoviae* (MS). Teniendo en cuenta su importancia y la necesidad de conocer y diferenciar las diferentes especies de micoplasmas presentes en las explotaciones avícolas, se tomaron 91 muestras de hisopos traqueales de aves con síntomas respiratorios, provenientes de igual número de granjas de pollo de engorde, ponedoras comerciales y reproductoras pesadas ubicadas en los departamentos de Cundinamarca y Boyacá, Colombia, y se determinó la presencia de MG y MS por la técnica de PCR. La prevalencia determinada fue de 39,6 % para MG y 47,3 % para MS, encontrándose diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó la positividad a MG y MS y el tipo de explotación ($p < 0,05$), siendo mayor la presentación en ponedoras y reproductoras que en explotaciones de pollo de engorde. Se encontraron diferencias cuando se compararon los resultados en diferentes grupos etáreos, siendo mayor el porcentaje de positividad para MG y MS en las aves con edades entre 20 y 60 semanas tanto en ponedoras comerciales como en repro-

526 Artículo - Detección y diferenciación de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* mediante la técnica de PCR a partir de hisopos traqueales de aves con síntomas respiratorios. Ventura, *et al.*

ductoras, mientras que en el grupo de pollo de engorde se encontró una mayor positividad para MG en aves de cinco semanas y para MS en aves de dos semanas.

Palabras clave: *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, PCR.

ABSTRACT

Mycoplasmas are worldwide pathogens that affect the poultry industry causing respiratory illness which cause a negative economic impact. Two mycoplasmas species are the most important in the commercial poultry: *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and *Mycoplasma synoviae* (MS). By its importance and necessity to know and differentiate between mycoplasmas species in local poultry houses this study used the PCR technique like a diagnosis tool, using tracheal swabs from bird with respiratory symptoms. A total of 91 samples from broilers, layers and breeders farms located in the departments of Cundinamarca and Boyacá was processed. The punctual prevalence founded in this study was 39.6 % for MG and 47.3 % for MS. Statistical differences for type of production and positive samples for MG y MS ($p < 0.05$) were founded, a bigger number of positive samples from layers and breeder in comparison to broilers was found. In the same way, the positive samples for the layers and breeder from the age group between 20 and 60 weeks was greater, while for the broilers group most of the positive samples were from five weeks old birds for MG and two weeks old birds for MS.

Keywords: *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, PCR.

INTRODUCCIÓN

Se considera a la micoplasmosis aviar ocasionada por *Mycoplasma gallisepticum* (MG) y/o *Mycoplasma synoviae* (MS) como una de las enfermedades aviares de mayor impacto económico en las explotaciones de pollos de engorde, ponedoras comerciales y reproductoras alrededor del mundo (Kleven, 2006) siendo una enfermedad de declaración obligatoria de acuerdo con la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2004). La micoplasmosis aviar es de gran importancia por el impacto negativo que ocasiona en los parámetros productivos, caracterizándose por ocasionar una disminución en la producción de huevos y baja calidad de los mismos en aves productoras de huevo comercial o por reducir la incubabilidad y ocasionar una alta tasa de mortalidad embrionaria en reproductoras livianas y pesadas, además de llevar a una alta selección de pollitos y pollitas¹ de un día de edad en las incubadoras y a un aumento de la conversión alimenticia² en las granjas de producción (Nascimento *et al.*, 2009). En pollos de engorde, por su parte, produce disminución en la ganancia de peso e incremento en la

¹ Corresponde a la clasificación zootécnica que se realiza a las aves después de su nacimiento en las plantas de incubación.

² Parámetro zootécnico que evalúa la eficiencia productiva del alimento en las explotaciones avícolas, relacionando los kilos de alimento consumidos con los kilos de producción obtenidos.

tasa de decomisos en las plantas de sacrificio (OIE, 2008). Igualmente se considera que la infección por micoplasma facilita la presentación de otras infecciones respiratorias de tipo viral como la enfermedad de Newcastle y la bronquitis infecciosa aviar o de tipo bacteriano, principalmente por *Escherichia coli*, llevando en muchas ocasiones a la presentación de la Enfermedad Respiratoria Crónica (ERC) en las aves (Bencina, 2009). Del mismo modo, la presencia de micoplasmas se ha asociado a complicaciones posvacunales por contribuir en la generación de reacciones excesivas y/o prolongadas en lotes de pollo infectados (Butcher, 2002).

Actualmente el diagnóstico de la enfermedad se basa principalmente en pruebas serológicas como la prueba de aglutinación rápida en placa, la técnica de ELISA y la prueba de inhibición de la hemaglutinación (Cerdá, 2007). El aislamiento bacteriano es otro método de diagnóstico, pero es dispendioso y costoso por lo cual su uso es limitado. En la actualidad se ha incrementado el uso de vacunas vivas y bacterinas de *M. gallisepticum* y de *M. synoviae* como método de control de los signos clínicos de la enfermedad en las granjas (Ley *et al.*, 1997; Feberwee *et al.*, 2006), haciéndose necesario el empleo de herramientas diagnósticas más sensibles y específicas que permitan establecer el origen de las infecciones y diferenciar entre cepas vacunales y cepas de campo, lo cual es indispensable para establecer el comportamiento de la enfermedad en las granjas y así plantear mejores medidas de control.

En este sentido, técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasas (PCR), la cual detecta la presencia de la bacteria a partir de su ácido nucleico, es una alternativa diagnóstica que ofrece una alta sensibilidad y especificidad.

Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de este trabajo de investigación fue establecer la presencia y ofrecer alternativas para la diferenciación de las dos principales especies de micoplasmas: MG y MS, mediante el uso de la técnica de PCR a partir de hisopos traqueales provenientes de lotes de aves que reportaron problemas respiratorios actuales y/o recientes en granjas de los departamentos de Cundinamarca y Boyacá.

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTRAS DEL ESTUDIO

En el laboratorio de Virología Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia se recibieron entre los meses de septiembre de 2011 y enero de 2012 un total de 91 muestras de hisopos traqueales³ de aves que presentaban historia de problemas respiratorios actuales y/o recientes, provenientes de explotaciones avícolas de diferente tipo así: 50 granjas de pollo de engorde, 35 de ponedoras comerciales y seis de reproductoras pesadas, las cuales estaban ubicadas en los departamentos de Boyacá y Cundinamarca. Las muestras de hisopos traqueales se conservaron en tubos eppendorf a -20 °C hasta su procesamiento en el laboratorio. No se uso ningún tipo de medio de transporte o preservante en las muestras.

³ Los hisopos fueron tomados en grupo al momento de realizar las respectivas necropsias en el laboratorio.

528 Artículo - Detección y diferenciación de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* mediante la técnica de PCR a partir de hisopos traqueales de aves con síntomas respiratorios. Ventura, *et al.*

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se realizaron pruebas de Chi-Cuadrado mediante el uso del *software* Statistix 8.0.

EXTRACCIÓN DE ADN

Se realizó la extracción de ADN a partir de los hisopos, mediante un procedimiento modificado de (Hernández *et al.*, 2009), el cual consistió en tres lavados sucesivos en solución de PBS y centrifugación a 14000 rpm por diez minutos, seguido de resuspensión del pellet en 40 µl de PBS como volumen de elusión, el producto fue sometido a calentamiento a 100 °C por diez minutos y a un enfriamiento de -20 °C por diez min. Finalmente con una centrifugación a 14000 rpm por diez min y transferencia de los sobrenadantes a un tubo libre de nucleasas, conservándose a -20 °C hasta su uso.

Para verificar la calidad del ADN extraído se utilizó como *Housekeeping* celular, (Tabla 1), una porción del gen 28S de *Gallus gallus* (Suzuki *et al.*, 2009), normalizado con las siguientes condiciones: 2 µl de buffer para PCR 10 X (Invitrogen® Buffer PCR 10 X), 0,8 µl de MgCl 50 mM (Invitrogen® MgCl 50 mM), 0,4 µl de nucleótidos a 10 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP Invitrogen®), 0,4 µl de primer F (50 µM Invitrogen®) y 0,4 µl de primer R (50 µM Invitrogen®), Taq Platino 0.125 µl de 5 U (Invitrogen® Taq Platino 5 u/µl), 13,88 µl de agua y 2 µl de ADN.

PROTOCOLO DE AMPLIFICACIÓN PARA *M. gallisepticum*

Se usaron primers previamente reportados (García *et al.*, 2005), (Tabla 1), que amplifican una región polimórfica del gen *mgc2*, el cual codifica para proteínas de superficie que están relacionadas con la citoaderencia (Hnatow *et al.*, 1998; Bencina, 2002) y permite la diferenciación de algunas cepas de MG directamente y mediante pruebas pos-PCR como la RFLP (*Restriction Fragment Length Polimorphism*).

El volumen final de cada reacción fue de 20 µl, y se usaron los siguientes volúmenes y concentraciones: 2 µl de buffer para PCR 10 X (Invitrogen® Buffer PCR 10 X), 0,52 µl de MgCl 50 mM (Invitrogen® MgCl 50 mM), 0,4 µl de nucleótidos a 10 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP Invitrogen®), 0,16 µl de primer F (50 µM Invitrogen®) y primer R (50 µM Invitrogen®), Taq Polimerasa 0.08 µl de 5 U (Invitrogen® Taq Polimerasa 5 u/µl), 14,68 µl de agua y 2 µl de ADN.

PROTOCOLO DE AMPLIFICACIÓN PARA *M. synoviae*

Se utilizaron primers previamente reportados (Wetzel *et al.*, 2010), ver Tabla 1, que amplifican con el gen *vlhA*, el cual es altamente polimórfico y codifica para proteínas del tipo hemaglutininas (Bencina, 2002).

El volumen final de cada reacción fue de 20 µl, con los siguientes volúmenes y concentraciones: 2 µl de buffer para PCR 10 X (Invitrogen® Buffer PCR 10 X), 0,8 µl de MgCl 50 mM (Invitrogen® MgCl 50 mM), 0,4 µl de nucleótidos a 10 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP Invitrogen®), 0,2 µl de primer F (50 µM Invitrogen®) y primer R (50 µM Invitrogen®), Taq Polimerasa 0.08 µl de 5 U (Invitrogen® Taq Polimerasa 5 u/µl), 14,32 µl de agua y 2 µl de ADN.

Como controles positivos de las reacciones se emplearon cepas vacunales: para el caso de MG se usó F-VAX-MG® que contiene la cepa F (Intervet-Schering Plough®) y para

Gen	Primers	Secuencia	Producto	Referencia
<i>mgc2</i>	MG-F	5' CGC AAT TTG GTC CTA ATC CCC AAC A 3'	303 pb	Garcia <i>et al.</i> , 2005
	MG-R	5' TAAACC CAC CTC CAG CTT TAT TTC C 3'		
<i>vlhA</i>	MS-F	5 CCA TTG CTC CTG CTG TTA T 3	300 pb	Wetzel <i>et al.</i> , 2010
	MS-R	5 GAT TCT GTT GTA GTT GCT TCA A 3		
28S	28S-F	5 GGC GAA GCC AGA GGA AAC T 3	61 pb	Suzuki <i>et al.</i> , 2009
	28S-R	5 GAC GAC CGA TTT GCA CGT C 3		

Tabla 1. Primers utilizados para *M. gallisepticum* (MG), *M. synoviae* (MS) y 28S *Gallus gallus*.

MS la vacuna MSBac® que contiene la cepa WVU-1853 (Fort Dodge Animal Health®). Se uso ADN de tejidos de pollo como control positivo del *housekeeping* celular.

Los amplificadores fueron obtenidos en un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient®, programado así: una denaturación inicial a 94 °C por 3 min, 39 ciclos de 94 °C por 30 seg, 53 °C por 30 seg, 72 °C por 90 seg y una extensión final de 72 °C por 5 min.

Para el *housekeeping* se uso el siguiente programa: una denaturación inicial de 94 °C por 5 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 58 °C por 30 seg, 72 °C por 60 seg y una extensión final de 72 °C por 10 min.

Las electroforesis para evaluar los productos de amplificación fueron corridas en agarosa al 1,5 % en buffer TAE 1 X, en un equipo PowerPac HC® (Bio-Rad Laboratories®) a 85 V por 95 min. Se usaron 5 µl de producto de PCR y 1 µl de EZ-Vision® (Amresco Life Science Research®) como buffer de carga y colorante. Como marcador de peso molecular se empleó el DNA GeneRuler 100 pb Plus® (Fermentas®). La lectura se hizo en un fotodocumentador GelDoc-XR® (Bio-Rad Laboratories®) bajo luz ultravioleta.

RESULTADOS

Se normalizó la técnica de PCR para diagnóstico de MG y MS a partir de muestras de campo y se obtuvieron los amplificadores esperados de 300 pb para cada uno de los agentes analizados MG (Fig.1) y MS (Fig.2). Del mismo modo, se confirmó el amplificado de 61 pb del *housekeeping* celular en la totalidad de las muestras procesadas.

Del total de 91 muestras procesadas, 36 (39,6 %) fueron positivas para *M. gallisepticum* (MG) y 43 (47,3 %) fueron positivas para *M. synoviae* (MS).

Se observó que el mayor porcentaje de positividad tanto para MG como para MS fue encontrado en las muestras de ponedoras y reproductoras como se indica en la Tabla 2. En cuanto a la presentación de infecciones mixtas por MG y MS, solo se encontró en dos muestras (4 %) en el grupo de pollo de engorde, mientras que en el grupo de ponedoras fue del 34,3 % (12/35) y en el de reproductoras del 16,7 % (1/6).

Para facilidad del análisis y ver el efecto de la edad en la presentación de MG y MS en las ponedoras y reproductoras que son aves de ciclo largo⁴, se consideraron cuatro grupos etáreos: I: 0-20 semanas, II: 21-40 semanas, III: 41-60 semanas y IV: mayor a 61 semanas, a diferencia del grupo de pollo de engorde donde el análisis se hizo tomando las semanas de edad de la uno a la cinco.

⁴ Las aves comerciales pueden ser clasificadas como aves de ciclo largo que pueden llegar hasta las 80 o más semanas de edad y las de ciclo corto llegar hasta cinco semanas de edad.



530 Artículo - Detección y diferenciación de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* mediante la técnica de PCR a partir de hisopos traqueales de aves con síntomas respiratorios. Ventura, *et al.*

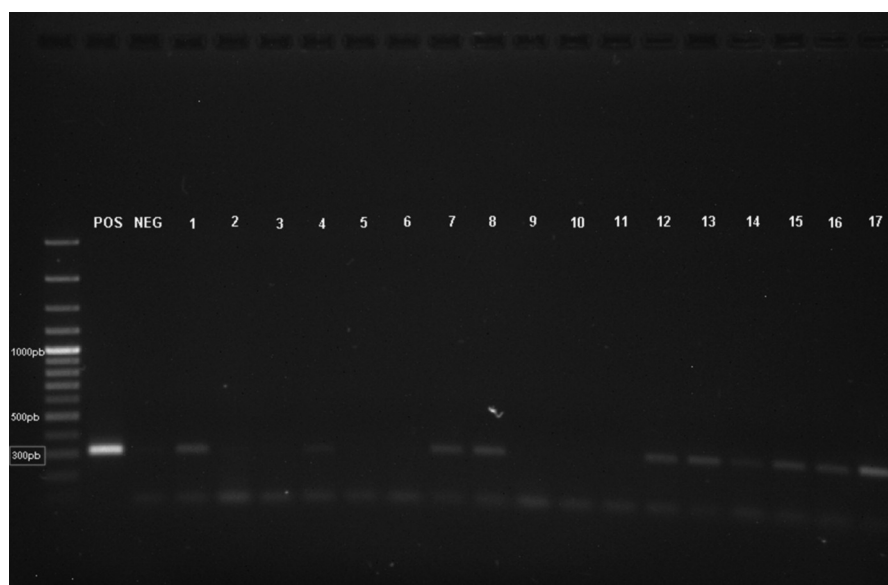


Figura 1. Amplificados del gen *mgc2*. Marcador de peso molecular de 100 pb. Líneas de controles positivo y negativo. Líneas 1 a 17: muestras de campo.

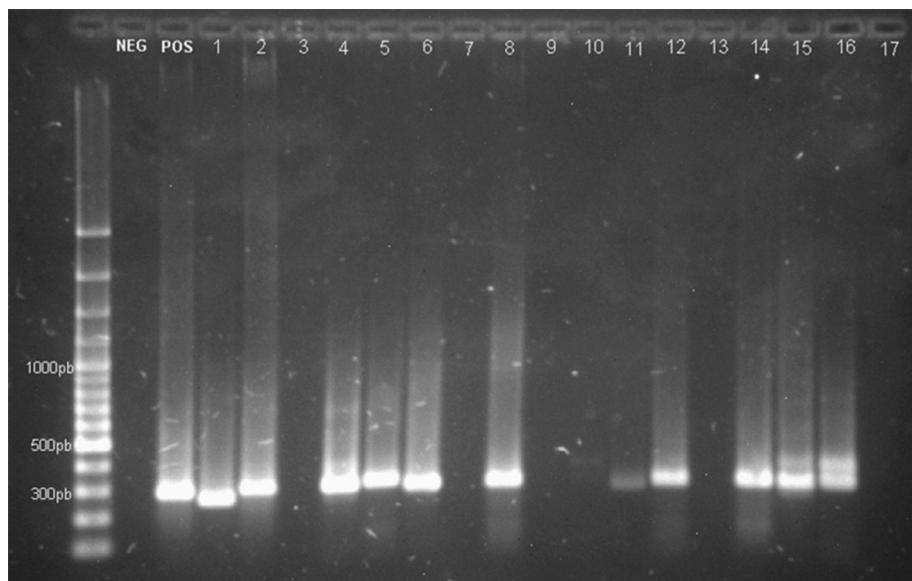


Figura 2. Amplificados del gen *vlhA*. Marcador de peso molecular de 100 pb. Líneas de controles positivo y negativo. Líneas 1 a 17: muestras de campo.

En relación a la distribución de positividad mixta por grupo de edad, se halló que en el grupo de pollo de engorde las dos muestras correspondían a aves de cuatro semanas de edad, una muestra del grupo de reproductoras era de aves entre 41 y 60 semanas, mien-



Tipo de Explotación	MG	MS
Pollo de engorde	13/50 26 % ^a	16/50 32 % ^a
Ponedoras	19/35 54,3 % ^b	24/35 69,6 % ^b
Reproductoras	4/6 66,7 % ^b	3/6 50 % ^b

Tabla 2. Distribución de positividad de *M. gallisepticum* (MG) y *M. synoviae* (MS) por tipo de explotación.

^{a,b} Letras diferentes en filas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

tras que en el grupo de ponedoras el 75 % (9/12) de las infecciones mixtas eran aves entre 21 y 40 semanas de edad y el otro 25 % eran aves entre 41 y 60 semanas de edad. Al analizar los resultados de acuerdo con la distribución por rangos de edad de las aves frente a la presencia de MG y/o MS, se encontró que en el grupo de pollo de engorde el mayor porcentaje de positivos a MG estaba en las aves de cinco semanas y para MS en las de dos semanas de edad (Tabla 3), mientras que en el grupo de ponedoras la presentación de positivos a MG fue mayor en las aves con edades entre 21 y 40 semanas, y para MS la positividad fue del 100 % para el grupo de 41 y 60 semanas de edad (Tabla 4).

Edad	MG	MS
Semana 1	1/7 14,3 %	2/7 28,6 %
Semana 2	4/10 40 %	5/10 50 %
Semana 3	4/21 19 %	6/21 28,6 %
Semana 4	2/9 22,2 %	3/9 33,3 %
Semana 5	2/3 66,6 %	0/3 0 %

Tabla 3. Distribución de positividad a *M. gallisepticum* (MG) y *M. synoviae* (MS) por grupo de edad para pollo de engorde.

Edad	MG	MS
Semana 1 a 20	4/8 50 % ^a	4/8 50 % ^a
Semana 21 a 40	12/19 63,2 % ^a	13/19 68,4 % ^a
Semana 41 a 60	3/7 42,8 % ^a	7/7 100 % ^b
Mayor a 61 semanas	0/1 0 %	0/1 0 %

Tabla 4. Distribución de positividad a *M. gallisepticum* (MG) y *M. synoviae* (MS) por rango de edad para ponedoras. ^{a,b} Letras diferentes en filas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

En relación al grupo de reproductoras se observó que de las cuatro granjas que fueron positivas para MG, el mayor porcentaje de positivos se presentó en el rango de edad de uno a 20 semanas, mientras que para MS el mayor porcentaje estuvo en el grupo de 41 a 60 semanas (Tabla 5).

Edad	MG	MS
Semana 1 a 20	1/1 100 %	0/1 0 %
Semana 21 a 40	2/3 66,6 %	1/3 33,3 %
Semana 41 a 60	1/2 50 %	2/2 100 %

Tabla 5. Distribución de positividad a *M. gallisepticum* (MG) y *M. synoviae* (MS) por rango de edad para reproductoras.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio confirman una alta prevalencia de MG y MS en las muestras analizadas. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tipos de explotación y la presentación de positividad a ambos agentes ($p < 0,05$), lo cual puede estar asociado directamente al tiempo que requiere la bacteria para infectar las aves en las granjas en los diferentes ciclos y tipos de producción (Kleven, 2000).

Es de resaltar que actualmente en Colombia, en las granjas avícolas no se usan vacunas vivas de MS y solo unas pocas emplean bacterinas, por lo cual los porcentajes de positividad encontrados en el presente trabajo deben corresponder a infecciones de campo. Esta situación requiere de un análisis y estudios posteriores para el grupo de pollo de engorde, buscando asociar la presentación del agente no solo a los problemas respiratorios reportados sino a la presentación de problemas articulares y locomotores (Jordan, 1975; Lockaby *et al.*, 1999) que se podrían deber a la presencia específica de MS en las granjas.

Así mismo, es importante considerar que la presentación de infecciones por MG solo o en infecciones mixtas con MS a nivel de campo, puede representar una complicación para el manejo farmacológico de las mismas, puesto que el uso de antimicoplásmicos específicos estaría contraindicado en aquellas granjas donde la presencia de MG sea de origen vacunal debido a que uno de los objetivos del uso de vacunas vivas es el desplazamiento de las cepas de campo⁵ y establecimiento de las cepas vacunales en las granjas (Kleven, 2005).

En Colombia se ha reportado positividad a MG y MS a través de pruebas de aglutinación rápida en placa, inhibición de la hemaglutinación (HI) y de ELISA. En la década

⁵ Las cepas vacunales de MG son capaces de contaminar las aves por encima de las cepas de campo, conservando la patogenicidad y estimulando la inmunidad pero sin producir síntomas de enfermedad.

del 80, se reportó en lotes de reproductoras de 16 y 71 semanas de edad ubicadas en el departamento de Santander un 74 % de positividad serológica para MG y de 44,4 % para MS (Colmenares y Latorre, 1987), mientras que un trabajo en pollos de engorde de granjas del centro del país reporta seropositividad a MG mediante la prueba de aglutinación rápida en placa del 60,7 % (Bustos, 1988). Un trabajo más reciente (Uribe, 2006), reporta seropositividad del 72 % a MS por la prueba de ELISA en granjas de reproductoras y del 10 % a MG en lotes de pollo de engorde. Estos resultados demuestran la presencia de la bacteria desde hace un par de décadas en el país, por lo cual, en la actualidad, los trabajos a nivel molecular son una herramienta de gran importancia en la caracterización y origen de las infecciones en las granjas.

Con relación a estudios empleando la técnica de PCR en nuestro país, recientemente se ha reportado un 17,4 % de positividad a MG en ponedoras comerciales del departamento de Antioquia (Borja *et al.*, 2009), lo cual contrasta fuertemente con el presente trabajo en el cual se encontró un 54,3 % en el grupo de ponedoras comerciales, explicado tal vez por las diferencias en los sistemas de producción de ambas zonas y al uso o no de vacunas vivas de MG en las diferentes granjas. En este trabajo no se reporta la situación de MS, por lo cual es importante realizar estudios que involucren ambos agentes.

De acuerdo con los resultados obtenidos no se encontraron diferencias estadísticas entre la positividad a MG y los diferentes grupos de edad en los tres tipos de explotación ($p > 0,05$), es decir que la infección por MG se puede presentar a cualquier edad en los diferentes tipos de explotación. Sin embargo, en el presente trabajo se encontraron aves de todos tipos de explotación positivas a ambos agentes de manera individual y mixta, a edades muy tempranas por lo cual se sugiere hacer estudios verticales donde se pueda evaluar la presencia de la enfermedad a nivel de las incubadoras, para de esta manera poder determinar si la presentación de la micoplasmosis es por transmisión vertical de las madres a la progenie o adquirida directamente en las granjas.

De otro lado, se encontraron diferencias significativas en la presentación de MS en el grupo de ponedoras para los diferentes grupos de edad ($p < 0.05$), observándose que la positividad aumenta con la edad de los lotes, es decir que la infección por MS al parecer se da de manera progresiva desde la etapa de levante hasta la fase de producción en las aves de postura de huevo.

Para poder conocer más sobre la dinámica de la infección por MG y MS en las granjas se deben llevar a cabo estudios que involucren todas las etapas de producción en los diversos tipos de explotación y asociarlo a los diferentes manejos, como son las densidades y el número de lotes de aves en las granjas, los planes vacunales usados, los tiempos de descanso o vacío sanitario de las mismas y los sistemas de producción (automáticos o manuales).

Del mismo modo, la detección temprana del patógeno mediante las pruebas de PCR puede ser de gran ayuda para establecer las medidas de control necesarias para evitar los efectos negativos de la micoplasmosis en las explotaciones avícolas.

Aunque se encontró positividad a ambos agentes en las granjas de ponedoras y reproductoras en el grupo de edad de una a 20 semanas, fue mucho menor que para las etapas de producción, lo cual podría estar asociado al mejor estatus sanitario de las granjas en las fases de levante de las aves, si se tiene en cuenta que es una práctica común en la industria el usar instalaciones de cría y levante separadas de las áreas de

534 Artículo - Detección y diferenciación de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* mediante la técnica de PCR a partir de hisopos traqueales de aves con síntomas respiratorios. Ventura, *et al.*

producción en el caso de ponedoras y condiciones “todo adentro todo afuera”⁶ en el caso de reproductoras, lo cual garantiza procesos de limpieza y bioseguridad mayores. No se conoce si en las granjas de procedencia de las muestras se usaron vacunas vivas de MG, por lo cual para determinar si la positividad encontrada corresponde a bacterias de origen vacunal o de campo, se sugiere llevar a cabo pruebas de diferenciación molecular como la RPFL a las muestras positivas de MG, con el fin de determinar si los patrones obtenidos corresponden a las cepas empleadas en la producción de las vacunas que actualmente se están usando en el país o si muestran un patrón diferente compatible con cepas de campo (Kempf, 1998).

Teniendo en cuenta los resultados aquí presentados, se recomienda hacer trabajos que involucren un mayor número de granjas de reproductoras y pollos de engorde para estudiar la posible ruta de transmisión de las gallinas a su progenie. Asimismo, es importante llevar a cabo estudios similares en otras regiones del país para poder conocer la situación de estos agentes en los diferentes sistemas de explotación comercial en el ámbito nacional.

AGRADECIMIENTOS

A Colciencias por la financiación del Proyecto 1101-405-20223 Contrato 424-2007. Al Dr. Jairo Rodríguez y a la Dra. Diana Paola Torres por su colaboración en la consecución y remisión de las muestras. A AMEVEA (Asociación Colombiana de Médicos Veterinarios Especialistas en Avicultura).

BIBLIOGRAFÍA

BENCINA D. Haemagglutinins of pathogenic avian mycoplasmas. *Avian Pathol.* 2002;31(6):535-547.

BENCINA D. *Mycoplasma Infections*. Biotechnical Faculty. University of Ljubljana; 2009. p. 1-11.

BORJA JV, OLIVERA M, MONTOYA F, GONZALEZ C, HERRERA A. Diagnóstico por PCR de *Mycoplasma gallisepticum* en sistemas de producción de huevo de mesa en el departamento de Antioquia. *Rev Colomb Cienc Pec.* 2009;22(3):479.

BUSTOS F. Prevalencia serológica para algunas enfermedades en pollos de engorde. En: *Sistemas de producción avícola*. Instituto Colombiano Agropecuario; 1988. p. 246-255.

BUTCHER G. *Mycoplasma gallisepticum* - A Continuing Problem in Commercial Poultry. Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida; 2002. p. 1-2.

CERDÁ R. Medidas de prevención y control de la micoplasmosis en Latinoamérica. XX Congreso Latinoamericano de Avicultura; 2007. p. 111-124.

COLMENARES M, LATORRE S. Determinación serológica de anticuerpos contra micoplasmas patógenos, *Salmonella pollorum* y presencia de anticuerpos vacunales de *new castle* en reproductores (Tesis). Universidad del Tolima; 1987. p. 59.

⁶ Práctica zootécnica en la que se mantienen en la misma granja un solo grupo de aves desde que las aves tienen un día de edad hasta cuando terminan su ciclo de producción

FEBERWEE A, LANDMAN W, BANNISEHT WYSMULLER T, KLINKENBERG D, VERNOOIJ JC, GIELKENS AL, STEGEMAN JA. The effect of a live vaccine on the horizontal transmission of *Mycoplasma gallisepticum*. Avian Pathol. 2006;35(5):359-366.

GARCÍA M, IKUTA N, LEVISOHN S, KLEVEN S. Evaluation and comparison of various PCR methods for detection of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. Avian Dis. 2005;49(1):125-132.

HERNÁNDEZ Y, LOBO E, MARTÍNEZ S, ZAMORA L. Evaluación de diferentes métodos de extracción de ADN de micoplasmas para su empleo en el diagnóstico por PCR. Rev Salud Anim. 2009;31(2):108-114.

HNATOW LL, KEELER CI, TESSMER LI, CZYMMEK K, DOHMS JE. Characterization of MGC2, a *Mycoplasma gallisepticum* Cytadhesin with homology to the *Mycoplasma pneumoniae* 30-Kilodalton Protein P30 and *Mycoplasma genitalium* P32. Infect Immun. 1998;66(7):3436-3442.

JORDAN F. Avian mycoplasma and pathogenicity - A review. Avian Pathol. 1975;4(3):165-174.

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

KLEVEN S. Control de Micoplasma Situación Actual. XXVII Seminario Avícola Internacional; 2006. p. 95-104.

KLEVEN S. Micoplasmosis. En: Enfermedades de las aves. Manual Moderno Editores; 2000. p. 195-239.

KLEVEN S. Prevention and control of avian mycoplasmas. Avian Insight. 2005;2(5):1-3.

LEY DH, MCLAREN JM, MILES AM, BARNES J, HEINS MILLER S, FRANZ G. Transmissibility of Live *Mycoplasma gallisepticum* Vaccine Strains ts-11 and 6/85 from vaccinated Layer Pullets to Sentinel Poultry. Avian Dis. 1997;41(1):187-194.

LOCKABY SB, HOERR FJ, LAUERMAN LH, SMITH BF, SAMOYLOV AM, TOIVIO-KINNUCAN MA, KLEVEN S. Factors Associated with Virulence of *Mycoplasma synoviae*. Avian Dis. 1999;43(2):251-261.

NASCIMENTO E, PEREIRA V, NASCIMENTO M, BARRETO M. Avian Mycoplasmosis Update. Braz J Poult Sci. 2009;7(1):1-9.

OIE. Micoplasmosis aviar (*Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*). Manual OIE sobre animales terrestres; 2008. p. 1-17.

OIE. Micoplasmosis Aviar - *Mycoplasma gallisepticum*. Manual de la OIE sobre animales terrestres; 2004. p. 905-919.

SUZUKI K, OKADA H, ITOH T, TADA T, MASE M, NAKAMURA K, et al. Association of increased pathogenicity of Asian H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses in chickens with highly efficient viral replication accompanied by early destruction of innate immune responses. J Virol. 2009;83(15):7475-7486.

URIBE A. Diagnóstico y control de la micoplasmosis aviar. XXVII Seminario Avícola Internacional; 2006. p. 43-45

WETZEL A, LEFEVRE KM, RAVIV Z Revised *Mycoplasma synoviae* v1hA PCRs. Avian Dis. 2010;54(4):1292-1297.

