

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA
UNAN-LEON
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**



**TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE:
LICENCIADO EN MEDICINA VETERIARIA**

**TEMA: SEROPREVALENCIA DE *Mycoplasma gallisepticum* EN GALLINAS
DE PATIO DE LA COMARCA CHACRASECA EN EL MUNICIPIO DE LEON.**

**PRESENTADO POR: Br. RICARDO ANTONIO PEREZ MONTES
Br. YASSER BENITO BARRIOS**

TUTOR: Dr. MIGDONIO QUINTANILLA DARCE

León 21 de Julio del 2009

I. INTRODUCCION

Mycoplasma gallisepticum tiene una distribución mundial y es particularmente importante en pollos y pavos como una causa de enfermedad respiratoria y de descenso de producción. En aves de corral la infección se transmite verticalmente a través de los huevos infectados y horizontalmente por contacto.

Esta enfermedad posee una gran importancia a nivel global dado que produce grandes pérdidas económicas con respecto al nivel de producción, calidad, costos de tratamiento, honorarios por servicios profesionales y trabajo extra. *Mycoplasma gallisepticum* (MG) se puede asociar con enfermedades respiratorias agudas en pollos y pavos, especialmente en aves jóvenes, siendo el pavo más susceptible.

La gravedad de la enfermedad está muy influenciada por el grado de infección secundaria con virus tales como el de la enfermedad de Newcastle y el de la bronquitis infecciosa, y/o con bacterias tales como *Escherichia coli*. Las lesiones del tracto respiratorio se manifiestan al principio por un exudado mucoso excesivo y después por exudación catarral gaseosa, que puede formar masas amorfas en los sacos aéreos.

En este trabajo se realizó un estudio de cohorte, el cual tiene como objetivo determinar la seroprevalencia de *Mycoplasma gallisepticum* en las gallinas de patio de la comarca Chacraseca, en donde la población es de 474 gallinas censadas por la encuesta, se tomó una muestra ajustada de 92 aves, a la cual se le aplicó la prueba de Enzimoimmunoensayo (ELISA) de captura de anticuerpos, los resultados se reflejan a través de gráficos.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la comarca Chacraseca se desconocen las causas de la mortalidad de las gallinas de patio, lo cual repercute negativamente en la economía y alimentación familiar debido a que la gallina es una de las fuentes de proteínas e ingresos monetarios.

III. ANTECEDENTES

En Nicaragua se han hecho pocos estudios sobre esta enfermedad según las referencias encontradas, se realizó un estudio de 1974 a 1980 en donde se diagnosticaron 63 casos de Mycoplasmosis en el Centro Nacional de Diagnósticos: Así como también en Costa Rica de Mayo de 1977 a 1979 en donde se diagnosticaron 46 casos en el laboratorio de patología Aviar de la Escuela de Medicina Veterinaria.⁵

En los reportes más recientes que van de 2005 a 2009 se establece que México es un país que posee la enfermedad pero sin signos clínicos en cambio Costa Rica posee la infección con la presencia de signos clínicos en el periodo 2006-2009.⁹

IV. JUSTIFICACIÓN

Actualmente en Nicaragua la producción avícola es parte importante de la economía de subsistencia y consumo. El poco conocimiento que tienen las personas sobre la evolución y manejo de esta enfermedad genera mucha controversia para entender los factores que puedan favorecer la aparición y diseminación de esta enfermedad.

En nuestro país no se tienen referencias concretas de la presencia de Mycoplasmosis al realizar este estudio se pretende establecer evidencia serológica de la enfermedad en la zona de estudio y crear una base de datos para contribuir a la realización de estudios posteriores.

V. OBJETIVOS

General:

Determinar la seroprevalencia de Mycoplasmosis en las gallinas de patio de la comarca Chacraseca del departamento de León.

Específicos:

Aplicar la técnica de Enzimoimmunoensayo (ELISA-indirecto) para la detección de anticuerpos frente a Mycoplasma Gallisepticum en suero de gallinas.

Cuantificar los casos positivos de Mycoplasmosis aviar en la comarca Chacraseca del departamento de León mediante la técnica de (ELISA).

VI. MARCO TEÓRICO

Concepto:

La Mycoplasmosis aviar está causada por varios Mycoplasmas patógenos de los cuales *Mycoplasma gallisepticum* es el más importante. Ocasiona enfermedad de declaración obligatoria según la Organización Internacional de Epizootias (OIE).

La Mycoplasmosis en aves (gallinas) es una de las tantas enfermedades que las afectan, el curso puede ser agudo o crónico y los síntomas que se observan con mayor frecuencia son estornudos, secreción nasal, sinusitis e inflamación Synovial. Esta enfermedad es una zoonosis cosmopolita y tiene mucha importancia ya que ocasiona daños en la salud y en la economía mundial.⁹

Desde los años 50 se realizó la serodivisión de los agentes de las enfermedades respiratorias. Nelson describió en 1936 unos corpúsculos filtrables de 500 nm, de diámetro, sólo cultivable en medios tisulares y embrión de pollo y la caracterizó como *Mycoplasma* (Enfermedad Respiratoria Crónica - CRD).⁵

Sinonimia:

- 1) Mycoplasmosis aviar.
- 2) Enfermedad de los sacos aéreos.
- 3) Aerosaculitis respiratoria.
- 4) Enfermedad Respiratoria Crónica (CRD).⁷

1. Historia

Fueron descubiertos en 1898 es una enfermedad infecciosa, contagiosa de carácter zoonótico de distribución mundial producida por cepas patógenos del género *Mycoplasma* incluida las especies, *M. meleagridis* y *M. synoviae* de importancia avícola las cuales son idénticas a sus características morfológicas en medio sólido pero diferente en epidemiología y serología. ⁵

Inicialmente fueron considerados como virus, ya que de manera general son capaces de atravesar filtros de 0,45 µm, que retienen el paso de las bacterias ordinarias, pero en 1930 al quedar establecida la verdadera naturaleza de los agentes virales, resultó evidente que los *Mycoplasmas* no podían ser considerados como tales, ya que presentan ambos tipos de ácidos nucleicos, crecen en medios artificiales y se dividen por fisión binaria al igual que las bacterias. En 1935, con el aislamiento de las formas (L) de bacterias, se consideró que estas eran *Mycoplasmas* viviendo en simbiosis con la bacteria, y tomó años en corregir esta falsa concepción puesto que se requería avances en el conocimiento de la estructura, composición y biosíntesis de la pared celular bacteriana. ⁸

La enfermedad fue descubierta primero en Inglaterra en pavos, más tarde se reportó en EEUU en pollos, palomas y posteriormente se distribuye al resto del mundo. Según la Organización Mundial de Epizootias (OIE) es de declaración obligatoria. ⁴

2. Importancia económica y sanitaria

Las especies patógenas para animales de consumo son de gran importancia para la salud pública. La *Mycoplasmosis* es una enfermedad de distribución mundial y por tanto produce considerables pérdidas económicas alrededor del mundo por motivar un descenso de 10 al 20% de la producción. ⁵

3. Etiología

Sabemos que mollicutis se toma de el griego mollis: blando; cutis: piel. Son aerobios facultativos o microaerofilos los Mycoplasma poseen variabilidad morfológica; tales como cocos, botellas pleomórficos y filamentosos. Son autoreplicables miden de 300 a 800 nm de diámetro no poseen pared, pero constante triple membrana plasmática forman colonias en forma de huevo frito se reproducen por fisión binaria la forma cocoide puede aumentar de tamaño y dividirse o pasar de forma filamentosa son Gram negativo pero se tiñen escasamente con la tinción Gram los medios adecuados son Giemsa y Romanowsky. Los mollicutis poseen un genoma de ADN de doble hebra.⁶

Bacteriología:

Taxonomía y clasificación:

Los Mycoplasmas que pertenecen a la clase mollicutis Mycoplasmatales y de la familia Mycoplasmataceae se han mencionado 22 especies del género Mycoplasma aunque sólo cuatro se han establecidos como patógenas para la industria avícola doméstica: Mycoplasma gallisepticum, M.synoviae para los pollos y pavos y también M.meleagridis y M.iowae para los pavos.

La mollicutis son bacterias de vida libre de menor tamaño, se caracterizan por carecer de mecanismos genéticos para formar la pared celular, forman colonia en forma de huevo frito (0001: 1.00 mm de diámetro en agar: son filtrables no revierten a las formas bacterianas con pared cuando se hacen paces a un medio no inhibitor). La morfología varía desde pleomórficos y filamentosas en medio líquidos se reproducen por fisión binaria.

Clasificación taxonómica y especies:

División:	Procariotas.
Clase:	Mollicutis.
Orden:	Mycoplasmatales.
Familia:	Mycoplasmataceae.
Género:	Mycoplasma.
Especies:	Patógena y apatógena. ⁶

4. Epidemiología

La infección de las aves ocurre generalmente de dos formas: vertical y horizontal. La vía vertical o transovárica se produce debido a que los *Mycoplasmas* colonizan principalmente el epitelio de la tráquea, las membranas de los sacos aéreos y la mucosa interna del oviducto. El huevo se contamina después del desprendimiento de la yema del ovario en la fase migratoria por el oviducto. La transmisión horizontal ocurre directamente por contacto entre las aves, por aspiración del polvo contaminado, el agua de bebida, los utensilios contaminados y a través de portadores intermediarios como el hombre. ⁶

El desencadenamiento de la enfermedad no depende exclusivamente del agente etiológico, sino que la favorece la disminución de la capacidad de resistencia a consecuencia de estados de "stress" La participación conjunta de otros gérmenes influye sobre el desencadenamiento y el curso de la *Mycoplasmosis*. ⁸

Unidos a otros patógenos origina un complejo de enfermedades respiratorias en pollos de engorde y pavos, disminuye la incubabilidad de los huevos se vincula con la encefalopatía en pavos, artritis y salpingitis en pollos. Se comprobó mediante inhibición de hemoaglutinación de Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (EGPA-SDS) que existe heterogeneidad entre las cepas virulencia y tropismo. Los pavos son más sensibles que los pollos y los jóvenes aún más.

De las aves domésticas el pollo y el pavo es el huésped natural se ha aislado de patos, de aves de jaula y silvestre, oviductos de gallinas, pavos y semen. La transmisión de la infección es de ave a ave huevos infectados de pollos y pavos, fómites y vía aérea. Participan aves silvestres e insectos.

Se ven preferentemente afectadas gallinas ponedoras de 4 a 8 semanas de edad, luego del inicio del periodo de puesta y broilers a partir de la cuarta semana. Los machos son más sensibles que las hembras los animales pueden estar infectados de forma latente⁶

Resistencia del agente etiológico:

Sólo sobrevive algunos días en medio ambiente, pero más si esta en ambientes fríos y presencia de exudados la mayoría de los mollicutis son microorganismos exigente para crecer, necesitan de un medio básico con un pH óptimo de 7.5 la temperatura óptima es de 37 a 39 C°. Son sensibles a sustancias que disminuyen la tensión superficial: jabones, amonios cuaternarios y tween, el yodo y los compuestos fenólicos lo destruyen con facilidad por lo general son resistente al acetato de talio y a los antibióticos del grupo de las penicilinas pero son sensibles a los que obstaculizan la síntesis de aminoácidos y ácidos nucleicos⁵

Especies susceptibles:

La especies de mayor importancia desde el punto de vista económico son aves, bóvidos, caprinos, cánidos, félicos, équidos y otras especies como múridos y suidos.

Hospedador de mantenimiento:

Son aquellos que aseguran la perpetuación de una población determinada de bacteria sin la intervención de algún hospedador accidental, se le llama reservorio.

En *Mycoplasma gallisepticum* afecta principalmente a pollos y a pavos a machos en mayor grado que a hembras y a jóvenes más que adultos se ha aislado en oviducto, huevos, semen y algunas aves.⁷

5. Patogenia

La principal vía de infección de aves por *Mycoplasma* es a través del aire. Estos entran en el tracto respiratorio y pueden afectar a la superficie de los cilios y las células epiteliales. Debido a la producción de diversos metabolitos tóxicos, sustancias y el agotamiento de los aminoácidos, ácidos grasos y el ADN por los precursores *Mycoplasma*, la función normal de las células epiteliales de la membrana mucosa de las vías respiratorias es perturbada. La excreción de moco cambia, la motilidad de los cilios es disminuida o incluso se detiene se pueden observar destrucción de los cilios. Debido a estos factores puede la bacteria desplazarse hacia los pulmones y alvéolos causando su daño. Los *Mycoplasma* pueden penetrar en la sangre durante la fase *Mycoplasmaemia*, puede propagarse por todo el organismo incluyendo las articulaciones, ovario, oviducto y otros órganos en ovario causa la disminución de los folículos, los huevos pueden estar contaminados por *Mycoplasma*. Como resultado, aumenta la mortalidad del embrión. Una característica importante de la infección por *Mycoplasma gallisepticum* es que puede persistir durante toda la vida del animal, incluso en presencia de los anticuerpos humorales.¹³

6. Cuadro clínico

El período de incubación de la *Mycoplasmosis* de la gallina varía entre 10 y 30 días. Los pollitos presentan a menudo conjuntivitis y una escasa secreción serosa entre los párpados y en los orificios nasales al comienzo de la enfermedad. En los lotes enfermos se oyen ruidos respiratorios, como especie de chasquidos y otros que denuncian la presencia de mucosidad en las vías respiratorias altas.

Los signos clínicos pueden variar de asintomáticos a síntomas respiratorios obvios como coriza, conjuntivitis, tos y estornudos. Puede ocurrir exudación nasal, estertor traqueal y soplos a través del pico parcialmente abiertos. También puede ser característica una sinusitis uní o bilateral. La conjuntivitis con exudado ocular espumoso es también una característica en aves y pollos.

El consumo de alimento disminuye ostensiblemente, el plumaje está erizado, los animales se encuentran abatidos y respiran con el pico abierto. Tras el adelgazamiento sobreviene finalmente la muerte. El curso ofrece un carácter insidioso en su conjunto y es lento en su desarrollo si se trata de animales jóvenes. Los lotes presentan gran desigualdad. Dan lugar a pesos muy reducidos, sobre todo en la terminación, aparte de que las bajas por muerte sean casi siempre más numerosas que en aves de postura. Los brotes de Mycoplasmosis en aves de postura van unidos a un descenso lento de la producción, cifrado entre el 5 y el 20%. Raras veces disminuye más. Si sucediera así, habría que pensar en la participación de otras infecciones, sobre todo de origen viral.

El grave perjuicio económico de las Mycoplasmosis no consiste tanto en el nivel de descenso de la producción como en la persistencia de éste durante varias semanas. Es muy frecuente que la Mycoplasmosis se transforme en un proceso marcadamente crónico en la gallina ponedora. Los animales adelgazan intensamente y se producen frecuentes bajas por muerte.⁵

7. Cuadro lesional

Coriza, estornudos, estertores húmedos y respiración por el pico parcialmente abierto; los signos se agravan con las infecciones intercaladas. La coriza es más grave en pavos que en pollos, además en los primeros se puede presentar sinusitis con inflamación de uno o ambos senos infraorbitales, la cual es lo bastante intensa para cerrar los ojos por completo a menudo el exudado nasal se acompaña de sinusitis. En los pollos casi nunca se observa inflamación de los senos infraorbitales. Conjuntivitis benigna con exudado de burbujas en el ojo.

A nivel respiratorio: Exceso de mucus en el tracto respiratorio, exudado catarral en la nariz, senos, tráquea, pulmones y sacos aéreos, edema de las paredes de los sacos aéreos.

En otras áreas: Pericarditis, perihepatitis y algunas veces, exudados y edema del tejido periarticular, exceso de fluido en las articulaciones, erosión de la superficie articular (artritis), inflamación de la bolsa y la membrana Synovial y palidez en áreas del cerebro.⁵

8. Diagnóstico

Los signos clínicos y lesiones patomorfológicas del tracto respiratorio observadas durante la infección por *Mycoplasma gallisepticum* no son patognomónicas para esta entidad, de ahí que el diagnóstico de la misma requiere de la confirmación en el laboratorio, para lo cual se emplean el cultivo y la identificación de esta especie por pruebas bioquímicas o inmunoquímicas como la Inmunofluorescencia o la Inmunoperoxidasa, técnicas serológicas como la seroaglutinación rápida en placas (SAR), la Inhibición de la hemoaglutinación (HIA) y el ensayo inmunoenzimático (ELISA) (Nepomuceno, 2000). Las muestras para el aislamiento pueden ser frotis de órganos o tejidos, exudados, homogenados tisulares diluidos, aspirados de los senos infraorbitales de cavidades articulares, material de la yema de huevo o de embriones. Los signos clínicos y las lesiones influirán en la selección de la muestra. Para el aislamiento se usan medios líquidos y sólidos, pero normalmente es necesario obtener colonias de *Mycoplasma* en medio sólido antes de intentar la identificación. En la clasificación inicial de los aislamientos son útiles las pruebas bioquímicas, pero la identificación final se hace por pruebas inmunológicas, siendo la prueba de anticuerpos fluorescentes y de inmunoperoxidasa las más satisfactorias.

La respuesta inmune después de la infección con *Mycoplasma gallisepticum* se inicia con la producción de IgM detectadas por (SAR) de 7 a 10 días después de la exposición con el microorganismo. Posteriormente se producen las inmunoglobulinas tipo G detectadas de 2 a 3 semanas después de la exposición, que pueden ser detectadas por (HIA y ELISA). El procedimiento de monitoreo serológico que se sigue normalmente para determinar si las aves se han infectado con *Mycoplasma gallisepticum*, consiste en efectuar primero la prueba de SAR y la confirmación con las técnicas de HIA o ELISA (Kleven y Yoder, 1989; Contreras, 2000; CFR, 2001).

Están también disponibles técnicas basadas en la tecnología de genes como la hibridación de ácidos nucleicos (HAN) (Fernández y col., 1993) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Kiss y col., 1997), estas últimas muy utilizadas pues permiten una rápida detección, con una alta especificidad y sensibilidad, pudiéndose trabajar con muestras directas (exudados de órganos) sin tener que realizar el cultivo de la especie. (Contreras, 2000).⁵

Cultivo:

Se toman muestras de aves vivas, de cadáveres frescos o de cadáveres de aves que fueron congelados cuando estaban frescos. También se pueden recoger muestras de embriones muertos dentro del huevo o de pollos o aves que han roto la cáscara pero no lograron salir del huevo. En aves vivas, se pueden tomar frotis de la hendidura coanal, orofaringe, esófago, tráquea, cloaca y falo. En el caso de aves muertas, se pueden tomar muestras de la cavidad nasal, seno infraorbital, tráquea o sacos aéreos. Los exudados se pueden aspirar de los senos infraorbitales y de las cavidades articulares. Todas las muestras deben examinarse tan pronto como sea posible después de su recolección. Si es necesario el transporte, se deben poner pequeños trozos de tejido en medio líquido para *Mycoplasmas*.

Se han formulado varios medios de cultivo adecuados y el medio apropiado para aislar *Mycoplasmas* aviares puede adquirirse de Mycoplasma Experience, Reigate, Surrey, United Kingdom. Los medios para *Mycoplasmas* contienen generalmente proteína hidrolizada y una base de infusión de carne suplementada con suero o una fracción sérica, factores de extracto de levaduras, glucosa e inhibidores bacterianos. Es importante que cada nuevo lote de medio se ensaye con cultivos de *Mycoplasma gallisepticum* de aislamiento reciente y bajo número de pasajes in vitro porque algunos componentes, especialmente el extracto de levadura y el suero pueden variar en cuanto a su capacidad para permitir el crecimiento.

Los siguientes medios líquidos y sólidos resultan también satisfactorios para el crecimiento de *Mycoplasma gallisepticum*:

- 1) Parte A: Medio líquido base para organismos como el de la pleuroneumonía (PPLO) sin cristal violeta (Difco) (14,7 g); agua destilada o desionizada (700 ml).
- 2) Parte B: Suero porcino (calentado a 56°C durante 1 hora) (150 ml); 25% (peso/volumen) de extracto de levadura fresco (100 ml); 10% (p/v) de solución de glucosa (10 ml); 5% (p/v) de acetato talioso (10 ml); 200.000 Unidades Internacionales (UI)/ml de penicilina G (5 ml); y 0,1% (p/v) de solución de rojo fenol (20 ml). El pH se ajusta a 7,8. El suero porcino puede ser reemplazado por suero de caballo.

Las muestras se inoculan en medio sólidas y líquidas para *Mycoplasmas*. El medio sólido ayuda a detectar colonias de *Mycoplasmas* de crecimiento lento, que pueden pasar desapercibidas en medio líquido por saprofitos. Puede ser necesario hacer diluciones de hasta 10⁻³ para tener éxito en el aislamiento. Las placas inoculadas se incuban a 37°C en recipientes sellados. Se ha descrito que una atmósfera con humedad y una tensión parcial de CO₂ creciente aumentan el crecimiento; estas condiciones se pueden establecer incluyendo un papel o lana de algodón húmedo e

inyectando en el contenedor 5–10% de CO₂ en nitrógeno, colocando una vela encendida en el contenedor, o usando un incubador con CO₂ o un sistema adecuado de generación de gas. Durante los primeros días, las placas se examinan diariamente para aparición de colonias con un microscopio estereoscópico. Los cultivos con material de campo no se deben considerar como negativos durante al menos 20 días. Las colonias de *Mycoplasmas* en medio sólido se pueden reconocer generalmente, aunque pueden no presentar la típica apariencia de "huevo frito".

Métodos inmunológicos:

1). Prueba de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpo:

La técnica recomendada para la prueba IFI (19) requiere un cultivo del aislamiento desconocido en medio sólido, que contenga numerosas colonias pequeñas y diferenciadas, un cultivo conocido de *Mycoplasma gallisepticum* como control positivo, y un cultivo de otra especie de *Mycoplasma*, como *M. synoviae* o *M. gallinarum* como control negativo. También se necesita un suero policlonal anti–MG de conejo. Del suero anti–MG, y del conjugado se determinan primero por titulación cruzada, y se seleccionan para uso diluciones dos a cuatro veces inferiores a los puntos finales reales.

2). Prueba indirecta de la inmunoperoxidasa:

Se basa en un principio similar al de la prueba IFI pero la unión de los anticuerpos específicos a las colonias se detecta in situ añadiendo una inmunoglobulina anti–conejo que está conjugada con el enzima peroxidasa. Luego se desarrolla una reacción positiva añadiendo el substrato apropiado que, por oxidación, produce colonias coloreadas. También se puede usar un procedimiento de inmunounión en que las colonias ensayadas se transfieren a nitrocelulosa y después reaccionan de una manera similar. Para el serotipado de aislamientos por IP, como por IFI, se deben utilizar anticuerpos policlonales.¹²

3). Prueba de inhibición del crecimiento:

El uso de métodos de detección de ADN específico es una alternativa al cultivo e identificación convencionales. Se puede detectar *Mycoplasma* por hibridación con sondas de ADN, pero en la actualidad es mucho más común usar la PCR para amplificar porciones específicas del ADN en el material analizado. Una prueba comercializada de ADN de *Mycoplasma* usa directamente PCR sobre el material extraído de frotis. Si el producto amplificado está presente se detecta utilizando una sonda no marcada radioactivamente. Se dispone dos versiones; una que detecta cepas de campo de *Mycoplasma gallisepticum* y otra que identifica la cepa vacunal F.

4). Prueba rápida de aglutinación sérica:

Se recogen sueros de una muestra de la bandada y, si no se ensayan inmediatamente, se mantienen a 4°C sin congelar. La prueba debe realizarse a temperatura ambiente (20–25°C) dentro de las 72 horas de la recogida del suero y los reactivos también deben estar a temperatura ambiente.

5). Prueba de la inhibición de la hemaglutinación:

Mycoplasma gallisepticum es capaz de hemaglutinar los hematíes aviares (RBCs), y la presencia de anticuerpos específicos en los sueros causa inhibición. Se debe seleccionar una cepa que crezca bien y que hemaglutine con seguridad. La prueba HI requiere un antígeno de *Mycoplasma gallisepticum* que sea satisfactoriamente hemaglutinante, hematíes frescos lavados de pollo o pavo, según proceda, y el suero a ensayar. El antígeno puede ser un cultivo fresco en medio líquido o una suspensión lavada y concentrada de *Mycoplasma* en PBS. Puede resultar difícil mantener un suministro de altos títulos de antígeno por cultivo en medio líquido; sin embargo, el uso de antígeno concentrado (que normalmente contiene 25–50% de glicerol y se guarda a –70°C) incrementa la probabilidad de reacciones inespecíficas.

6). Enzimoinmunoensayo:

Se encuentran en el mercado algunas preparaciones comercializadas de ELISA para anticuerpos frente a *Mycoplasma*. La sensibilidad viene determinada en cierto modo por las recomendaciones de los fabricantes en cuanto a los niveles de corte para considerar las reacciones positivas y sospechosas. A veces la sensibilidad puede estar "amortiguada", para evitar las bien conocidas reacciones cruzadas entre *Mycoplasma* y *Mycoplasma synoviae*.

ELISA usa un anticuerpo monoclonal (MAb) que reconoce un epítipo de un polipéptido de 56 kDa de *Mycoplasma*.⁶ En este sistema, las placas de ELISA están recubiertas con antígeno de células enteras de *Mycoplasma* y los sueros ensayados se añaden como en el método convencional indirecto de ELISA, pero la reacción se basa en la medida del bloqueo que ocurre cuando se añade el MAb conjugado.²

Diagnóstico diferencial:

Pollos:	BIA, NC (<i>Mycoplasma gallisepticum</i> suele ser complicante) Coriza, cólera, E.coli (cultivo).
Pavos:	TRT (Pneumovirus) Coriza del pavo (<i>B. avium</i>) ORT (<i>O. rhinotracheale</i>) Ornitosis (<i>C. psittaci</i>) <i>Mycoplasma meleagridis</i> Influenza. Enfermedad de Newcastle Aspergilosis

9. Tratamiento

Debemos tomar todas las medidas necesarias para evitar que la enfermedad ingrese en la granja. La transmisión a través del aire es posible en distancias de hasta 1 km, sin embargo la transmisión mecánica es mucho más frecuente, ya sea a través de vectores como aves silvestres y roedores, o a través del personal o implementos entre distintas granjas.

Los Mycoplasmas son microorganismos frágiles, que viven fuera de las aves menos de 1 semana, por lo cual el vacío sanitario total entre lotes, de al menos 4 días garantiza que el ciclo de enfermedad termine. Los antibióticos que se utilizan en la prevención y tratamiento de las Mycoplasmosis aviares, pertenecen al grupo de los Macrólidos. Estos actúan inhibiendo la síntesis proteica en los microorganismos sensibles.

Las drogas utilizadas más frecuentemente son:

- 1) Macrólidos (Tilosina, espiramicina)
- 2) Tetraciclinas
- 3) Aminoglicósidos (lincomicina+espectinomina, neomicina, gentamicina)
- 4) Fluoroquinolonas (enrofloxacina, danofloxacina)
- 5) Eritromicina
- 6) Tiamulina

Prevención y control:

Para prevenir y controlar la enfermedad se recomienda:

Adquisición de pollitas de libre de Mycoplasma, evitar explotar aves de distintas edades en un mismo patio, eliminación de lotes afectados.

Realizar pruebas serológicas en los reproductores para garantizar que estos se encuentren libre de la enfermedad y no transmitirán la enfermedad a la descendencia. Incubar huevos procedentes de aves negativas a las pruebas serológicas empleadas para la detección de anticuerpos contra la enfermedad crónica respiratoria, (E.R.C). Antes de colocar los huevos en la incubadora se recomienda sumergirlos en una solución de tartrato de tilosina, 2000 ppm, en agua fría.

Para controlar la enfermedad se recomienda la despoblación del efectivo y desinfectar el equipo e instalaciones en que han estado alojados los animales infectados dándole un reposo mínimo a los galpones de al menos 4 semanas después de la salida del lote problema. Para evitar la entrada de la enfermedad por medio de portadores se recomienda segregar las aves por edades.⁶

10. Uso de vacunas

La utilización de vacunas permite generar inmunidad contra estas bacterias, sin que se produzcan residuos de antibióticos que requieran de períodos de retiro. Una condición imprescindible para que sean exitosas es llegar al momento de la vacunación con aves libres, sin infección de campo de *Mycoplasmas*. Por lo tanto, sólo podremos vacunar aves que hayan sido recibidas libres y mantenidas en esta condición hasta la vacunación. Los pollitos pueden vacunarse a partir de la cuarta semana de edad para lograr la inmunización básica hace falta una vacunación a las 4-8 semanas de vida.¹⁰

Vacunas Inactivadas:

Las bacterinas permiten reducir la diseminación y multiplicación de los *Mycoplasmas* dentro del ave, disminuyendo la transmisión horizontal y vertical y minimizando las pérdidas productivas. No previenen la infección de las aves.

La respuesta de anticuerpos que originan, complica los métodos tradicionales de diagnóstico y dificulta conocer el momento en que los lotes toman contacto con los *Mycoplasmas* de campo.

Para obtener una protección duradera, deben recibir durante la crianza 2 dosis. Su costo es elevado y son aplicadas en forma individual.

Vacunas vivas:

Hay disponibles vacunas vivas contra *Mycoplasma gallisepticum*, como la Cepa F, y las cepas termosensibles 6/85. Estas vacunas colonizan principalmente el tracto respiratorio superior y brindan protección contra la infección por cepas de campo.

Por diferentes motivos, no todas estas vacunas están disponibles en varios países de Latinoamérica.

Hay numerosos reportes de desplazamiento de cepas de campo de *Mycoplasma gallisepticum* a través del uso de la Cepa F. Esta cepa es patógena para los pavos. Las diferentes cepas vacúnales varían en su capacidad de diseminación entre aves y en sus niveles de protección, coincidiendo todas en que una sola dosis, si se aplica correctamente sobre aves libres, brinda un período de protección prolongado. Las cepas termosensibles no crecen a las temperaturas normales del tracto reproductor, de al menos 41°C, por lo cual no hay transmisión vertical de estas cepas. No deben utilizarse productos antimicoplásmicos al menos por varias semanas después de haber vacunado, dado que pueden eliminar la cepa vacunal, perdiéndose la capacidad protectora de las mismas³

VII. HIPOTESIS

La prevalencia esperada en nuestro estudio es igual a la prevalencia observada.

VIII. DISEÑO METODOLOGICO

1. Tipo de estudio

El estudio aplicado a la investigación es un estudio transversal.

2. Área de estudio

Se llevó acabo en la comarca Chacraseca en gallinas de patio se seleccionó por conveniencia, fácil acceso y cooperación de las personas.

3. Tamaño de muestra

Para la determinación del tamaño de muestra, se realizó un cálculo utilizando el programa Win Episcope 2.0, determinación de porcentajes. A partir de una población de 474 gallinas mayores de 19 semanas de edad con una prevalencia esperada de 8 %, un error aceptado del 5 % y un nivel de confianza del 95 %. El tamaño de la muestra ajustada será de 92 gallinas.

4. Material y método

Kit para la detección de anticuerpos frente a *Mycoplasma gallisepticum*:

Flockcheck* es un inmunoanálisis enzimático de IDEXX diseñado para la detección de anticuerpos frente a en suero de pollo y pavo.

Descripción y principios:

Este análisis está diseñado para medir la concentración relativa de anticuerpos frente al *Mycoplasma gallisepticum* en suero de pollos y pavo. Cada placa dispone de 96 pozos recubiertos con el antígeno de *Mycoplasma gallisepticum*. Tras un periodo de incubación de la muestra en el pozo recubierto, los anticuerpos específicos frente al *Mycoplasma gallisepticum* presente en la muestra formarán un complejo con los antígenos de la placa. Después de eliminar por lavado el material no unido, se añade a los pozos un conjugado que se une a los anticuerpos presentes en la placa. El conjugado no unido se elimina tras el lavado de la placa y se agrega a los pozos un sustrato enzimático. El cambio de color resultante es directamente relacionado con la cantidad de anticuerpos anti-MG presentes en la muestra.

Reactivos:

1) Placas recubiertas con antígeno (<i>Mycoplasma gallisepticum</i>).	1
2) Control positivo MG de pollo diluido. Conservado con azida de sodio.	1,9 ml
3) Control negativo – Suero de pollo diluido, no reactivo al anti – (MG). Conservado con azida de sodio.	1,9 ml
4) Conjugado anti – pollo (de cabra): peroxidasa de rábano. Conservado con gentamicina.	50 ml.
5) Diluyente para la muestra tampón. Conservada con azida de sodio	235ml
6) TMB sustrato	60 ml.
7) Solución de frenado	60 ml.

Preparación de la muestra:

Se diluye la muestra 1:500 con el diluyente de la muestra antes de realizar el análisis (es decir, diluya 1 µl de la muestra con 500 µl de diluyente).

Procedimiento de la prueba:

Los reactivos deben atemperarse y luego agitarse por inversión y con un movimiento circular.

- 1) Tome la placa recubiertas con antígenos y anote la posición de la muestra en una hoja de trabajo Flockchek.
- 2) Añada 100 µl de control negativo no diluido en los pocillos A1 y A2.
- 3) Añada 100 µl de control positivo no diluido en los pocillos A3 y A4.
- 4) Añada 100 µl diluida en los pocillos correspondientes.
- 5) Incube durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 6) Lave cada pocillo de 3 a 5 veces con unos 350 µl de agua destilada o des-ionizada.
- 7) Añada 100 µl de conjugado anti-pollo (de cabra) anti pavos (de cabras); peroxidasa de rábano a cada pocillo a cada pocillo.
- 8) Incube durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 9) Repita el paso 6.
- 10) Añada 100 µl de la solución de sustrato TMB en cada pocillo.
- 11) Incube durante 15 minutos a temperatura ambientes.
- 12) Añada 100 de la solución de la interrupción en cada pocillo par frenar la reacción.
- 13) calibre el lector en blanco con aire.
- 14) Mida y anote los valores de absorbancia a 650 nm, A (650).

Resultados:

Para que el ensayo sea válido, la diferencia entre la absorción promedio de control positivo y de control negativo (PCx-NCx) debe ser mayor de 0,075. La absorbancia promedio del control negativo debe ser menor o igual que 0,150. La presencia o ausencia de anticuerpos frente a *Mycoplasma gallisepticum* se determina por medio de una relación entre el valor de A (650) de la muestra con el promedio del control positivo.

El control positivo esta normalizado y representa concentraciones significativas de anticuerpos anti-MG en el suero de pollo y pavo. La concentración relativa de anticuerpos en la muestra se determina a través de cálculo del cociente de la absorbancia de la muestra con respecto a la del control positivo, MP. Los títulos finales se calculan a partir de la ecuación que aparece en la sección de cálculos.

Interpretación de los resultados:

Las muestras de suero que tengan cociente MP inferiores o iguales a 0,5 deben considerarse negativas. Los cocientes MP superiores a 0,5 (títulos superiores a 1076) deben considerarse positivas e indican que ha habido inmunización u otro tipo exposición al Mycoplasma. Cada laboratorio debe establecer su propio criterio inmunidad con respecto al título de anticuerpos, de acuerdo con la correlación del flockchek: anti-MG con los métodos de laboratorios actuales, y las respuestas de los anticuerpos observados en el pasado.

Materiales:

1. Jeringa de 3 cc.
2. Aguja calibre 23.
3. Algodón
4. Alcohol
5. Papel toalla
6. Micro Pipeta
7. Puntas de 1 ml
8. Puntas 0.5 ml
9. Gradillas para viales
10. Viales para muestra 92
11. Viales para dilución 96
12. Multicanales 50 a 300
13. Agua destilada
14. Probeta 1
15. Papel aluminio
16. Guantes de goma
17. Homogenizador

Toma de muestra sanguínea de la vena axilar:

En las gallinas adultas éste es el lugar de elección también llamada vena cutánea, ulnar o vena braquial la cual cruza ventral y superficialmente la articulación húmero radio-ulnar inmediatamente por debajo de la piel siendo muy fácil su identificación después de haber apartado las plumas o quitado algunas de ellas. La sangre se extrae con aguja fina 23.

IX. RESULTADOS

1. Se determinó que la seroprevalencia frente a *Mycoplasma gallisepticum* en la zona objeto de estudio es 40%.
2. A partir de la información obtenida rechazamos la hipótesis nula.
3. El 86% de las aves analizadas equivalentes a 79, no reciben ningún tipo de vacunación.
4. Los propietarios de 77% de los patios encuestados no reciben ningún tipo de asistencia técnica, sólo el 23% recibe.

X. CONCLUSIONES

Se confirma la serología positiva frente a *Mycoplasma gallisepticum* en las gallinas de patio de la comarca Chacraseca.

Se establece que bajo las condiciones de realización del estudio la seroprevalencia de *Mycoplasma gallisepticum* en aves de patio es 40% equivalente a 37 aves de la muestra, mediante el análisis de suero sanguíneo por el método de ELISA indirecto, por esta razón rechazamos la hipótesis nula.

Según la prueba realizada bajos los criterios del fabricante se puede decir que los sujetos de estudio son reactivos al agente patógeno y que en algún momento de vida tuvieron contacto con éste.

XI. RECOMENDACIONES

1. Realizar seguimiento serológico al menos una vez al año en la zona de estudio con el fin de mantener el estatus epidemiológico actualizado.
2. Manejar un programa de control sanitario de las aves traídas del exterior.
3. Implementar estudio epidemiológico en todo el municipio para verificar la información sanitaria de la enfermedad de *Mycoplasma gallisepticum*
4. Consolidar y mejorar las medidas de bioseguridad en la zona.
5. Desarrollar un plan de capacitación dirigido a los propietarios y manejadores de aves de patio para aumentar el conocimiento sobre las distintas enfermedades y su importancia en la salud pública.
6. Ampliar la base de datos de *Mycoplasma gallisepticum* en el municipio de León.
7. Asegurar la confiabilidad de los datos recopilados apoyándose en observaciones directa en el campo.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Biberstein, Ernst L., ed, Chung Zee Yuan, Manuel Ramis Vergés, tratado de microbiología veterinaria Acribia Zaragoza 1987.
- 2.- Brunner R. y otros Vacunación de los animales domésticos, R. Brunner y otros. Traducción Hans –Joachin Selbitz: Manfred Moos—Zaragoza España Acribia s.a 1997.
- 3.- Buxadé Carbó, Carlos. La gallina ponedora: sistema de explotación y técnicas de producción. 2a. ed. corr. y aum. Madrid; Ediciones Mundi-Prensa, 2000.
- 4.- Enfermedades de las aves consultada el 20/02/09 en el link:
<http://www.todofauna.com>
- 5.- Figueroa Max, Luis Vargas, [et al.]. Enfermedades infecciosas de los animales domésticos en Centroamerica., Publicado por EUNED, 1984. Consultada el 12/03/09 en el link: <http://books.google.com.ni/books>.
- 6.- Joachim, Beer, Ardoján Bartha. [et al.]. Enfermedades infecciosas de los animales domésticos; publicados bajo la dirección de con la colaboración de 46 científicos; traducido del alemán por: Jaime Esain Escobar. -- Zaragoza, España: Acribia, 1987.
- 7.- M. Pattison Jordan; trad. Ana Felicitas Martínez Haro. Enfermedades de las aves / ed. F. T. W. -- 3a. ed. -- México: El Manual Moderno, c1998. Xvii, 522 p. Il.
- 8.- Página oficial de las revistas redvet, consultada el 18/12/08 en el link:
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>
- 9.- Página oficial de organización de la organización internacional de epizootias.consultada el 20/05/09 en el link:
<http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf>

10. - Sasipreeyajan, J. Avian Dis. 31.776-81, 1987. Plan Nacional de Sanidad Avícola Manual de procedimientos. Consultada el 16/04/09 en el link:

www.produccion-animal.com

11.- Tratado de microbiología veterinaria / Manuel Ramis Vergés, trad. -- Zaragoza, España: Acríbia, c1990. xii, 673 p. Il.

12. - <http://fmvzenlinea.fmvz.unam.mx>

13. - [http://www.aviculturaargentina.com.ar/sanidad/microplasmosis aviaras](http://www.aviculturaargentina.com.ar/sanidad/microplasmosis_aviaras)

14. - <http://www.quiminet.com>

15. - <http://www.wpsa-aeca.com/wpsa.php>

ANEXOS

Gráfico 1.

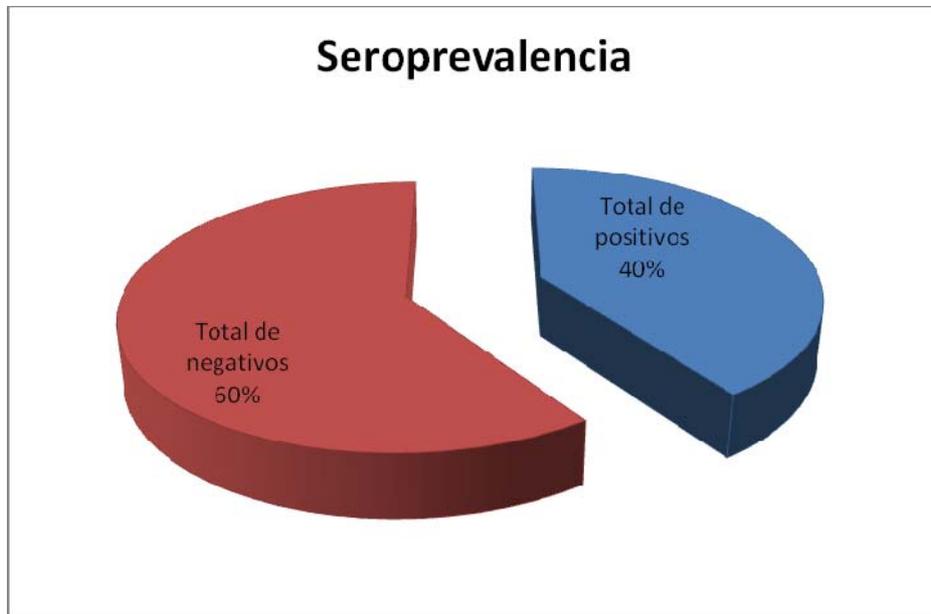


Gráfico 2.

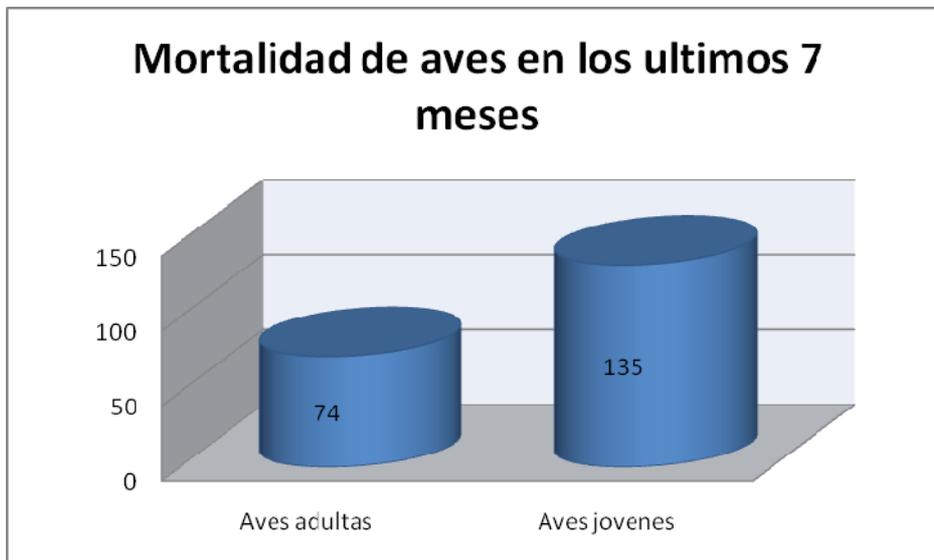


Gráfico 3.



Gráfico 4.



Mycoplasmas aviaries y huéspedes

Especie	Tipo de cepa	Huéspedes comunes
M.Anatis	1340	Pato
M.anseves	1219	Ganso
M.buteanis	BT26	Melano
M.Cloacale	383	pavo, ganso
M.Columbinasole	694	Paloma
M.Columbinom	MMP1	Paloma
M.Columerale	MMP4	Pichón
M.Coragypsi	bv1	Buitre
M.Falconis	14TI	Alcón
M.Gallinaceum	DD	Pollo
M.Gallinarum	P616	Pollo y Pavo
M.Gallisepiticum	P631	Pollo y Pavo
M.Gallopavonis	WR1	Pavo
M.Glycophilum	486	Pollo
M.Gypis	BLT1	Buitre
M.Imitans	H229	Pato, Ganso
M.Ineus	P630	Pollo, pavo
M.lowae	G95	Pollo, pavo
M.Lipofaciens	R171	Pollo, pavo
M.Meleaglidis	17529	Pavo
M.Pulldrum	CKK	Pollos ornato
M.Synoviae	WVU1053	Pollo, pavo, ornato. 7

Especies	Hospedador principal	Enfermedad
M. mycoides	Bóvidos	Perineumonía
M. Agalactiae bovis	Bóvidos	Mamitis
M. bovigenitalium	Bóvidos	Infecciones genitales
M. bovis	ternero, vacuno, adulto	Infecciones respiratorias
M. dispor	Cerdo	Neumonía enzootica
M. suis	Cerdo	Poliserositis
M. hyorhinis	Cerdo	Poliserositis
M. hyosynoviae	Cerdo	Artritis
M. hyogenitalium	Cerdo	metritis, mamitis
M. mycoides. Capri	Cabra	pleuroneumonía infecciosa
M. agalactia	Cabra, oveja	agalactia contagiosa
M. ovipneumoniae	Óvidos	agalactia contagiosa
M. pneumoniae	Hombre	Enfermedad de Eaton
A. laidlawii	Todos los animales domésticos	Neumonía poliserositis
A. axanthum	Vacas terneros, cerdos	Mamitis
Mycoplasma T	Hombre	infección urogenital ⁶

Aplicación de tratamiento:

Tartrato de tilosina:	Brinda buenos resultados se emplea en dosis de 0.5 Gramos por litro de agua de bebida, durante 2-3 días, dependiendo de la severidad de la infección
Glutamato de Eritromicina:	En concentraciones de 2 Gramos por galón de agua durante 3 días.
Espiramicina:	Se ha empleado para disminuir la infección en concentraciones de 2 Gramos por galón de agua durante 5-7 días dependiendo de la severidad de la infección
Tetraciclinas	En concentraciones de 100-500 Gramos por tonelada de alimento o en el agua de bebida en concentraciones de 0.5-1.0 Gramo por galón de agua han brindado resultados satisfactorios para controlar la infección secundaria.
Estreptomina:	En dosis de 25-250 miligramo por vía intramuscular. Con efectos beneficiosos para infecciones secundarias. En término generales puede asegurarse que no se ha encontrado un agente terapéutico eficaz para eliminar completamente la infección; sino que solo se dispone de fármacos para que disminuyan la infección por Mycoplasmas y controlan las infecciones secundarias. ⁵