

Universidad Autónoma de Sinaloa
Colegio de Ciencias Agropecuarias
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Doctorado en Ciencias Agropecuarias



TESIS:

“Identificación y ocurrencia molecular de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* en aves domésticas”

**Que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Agropecuarias**

PRESENTA:

Miguel Ángel Cháidez Ibarra

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Soila Maribel Gaxiola Camacho

CO-DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Idalia Enríquez Verdugo

Culiacán, Sinaloa, México; a 01 de Febrero de 2024

ESTA TESIS FUE REALIZADA POR **MIGUEL ÁNGEL CHÁIDEZ IBARRA**, BAJO LA DIRECCIÓN DEL CONSEJO PARTICULAR QUE SE INDICA, Y FUE APROBADA POR EL MISMO, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

**(SELLO DE
POSGRADO)**

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTORA

DRA. SOILA MARIBEL GAXIOLA CAMACHO

CO-DIRECTORA

DRA. IDALIA ENRÍQUEZ VERDUGO

ASESORA

DRA. NOEHMÍ CASTRO DEL CAMPO

ASESOR

DR. ARNULFO MONTERO PARDO

ASESOR

DR. MIGUEL ÁNGEL RODRÍGUEZ GAXIOLA

CULIACÁN, SINALOA, FEBRERO DE 2024

ÍNDICE DE CUADROS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE LITERATURA.....	1
1.1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.2 REVISIÓN DE LITERATURA	3
1.3 CONCLUSIONES.....	33
1.4 LITERATURA CITADA.....	34
CAPÍTULO 2. Ocurrencia global de <i>Mycoplasma gallisepticum</i> y <i>Mycoplasma synoviae</i> en aves domésticas: una revisión sistemática y un metanálisis	35
2.1 RESUMEN Y ABSTRACT.....	35
2.2 INTRODUCCIÓN.....	36
2.3 MÉTODOS.....	38
2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
2.5 CONCLUSIONES.....	58
2.6 LITERATURA CITADA.....	59
CAPÍTULO 3. Identificación y ocurrencia molecular de <i>Mycoplasma gallisepticum</i> y <i>Mycoplasma synoviae</i> en aves ponedoras comerciales de Sinaloa y Sonora, México	60
3.1 RESUMEN Y ABSTRACT.....	60
3.2 INTRODUCCIÓN.....	61
3.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	64
3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	71
3.5 CONCLUSIONES.....	85
3.6 LITERATURA CITADA.....	86

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
1	Preparación de las mezclas de oligonucleótidos LAMP.	22
2	Cantidad y componentes para el desarrollo de la reacción LAMP.	23
3	Resumen de condiciones de ciclado durante el proceso de la reacción PCR convencional con diferentes regiones genómicas diana según la especie de <i>Mycoplasma</i> .	28
4	Definición de criterios de elegibilidad para los estudios.	59
5	Ocurrencia mundial, regional y nacional de MG y MS en aves domésticas, estimada a partir de resultados extraídos de 85 publicaciones que incluyeron 110 estudios (62 para MG y 48 para MS).	65
6	Secuencia de oligonucleótidos dirigidos a los genes ARNr 16S y <i>mgc2</i> de MG y <i>vhA</i> de MS para PCR y LAMP reportadas en la literatura.	95
7	Mezcla de trabajo de cada oligonucleótido de PCR para la solución madre 10 μ M.	96
8	Preparación de las mezclas de oligonucleótidos LAMP con MG ARNr 23S y MS ARNr 16S.	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Diagrama de flujo PRISMA para la selección de estudios incluidos en la revisión sistemática y el metanálisis.	63
2	a) Distribución espacial de la ocurrencia estimada por patógeno y b) ocurrencia nacional estimada e IC del 95% para MG y MS.	68
3	Estimaciones de ocurrencia con IC del 95% por subpoblación para a) <i>M. gallisepticum</i> y b) <i>M. synoviae</i> .	69
4	Resultados del análisis de metarregresión según a) año de publicación para MG, b) nivel de contaminación atmosférica (PM _{2.5} , µg/m ³) para MG, c) tamaño de muestra evaluado por estudio para MG y d) nivel de contaminación atmosférica (PM _{2.5} , µg/m ³) para MS. ES = tamaño del efecto (tasas de ocurrencia). Se incluyeron solo covariables significativas para cada patógeno.	70
5	Estimación agrupada de la ocurrencia de MG y MS a través de detección molecular por LAMP en seis granjas de aves ponedoras de Sinaloa y Sonora.	101
6	a) Amplificación sin éxito con oligonucleótidos 16S y <i>vlhA</i> de PCR convencional con 35 ciclos, b) Amplificación exitosa con oligonucleótidos 16S y <i>vlhA</i> con 32 ciclos. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 4, arriba cepa vacunal TS11; carril 9, arriba cepa vacunal MS-H y abajo muestra clínica de granja. c) Amplificación con 32 ciclos carril positivo LAMP 16S MG con cepa vacunal TS11, carril falso positivo LAMP 16S MS con TS11 y falso negativo LAMP 16S MS con MS-H; d) Amplificación con 32 ciclos carril positivo LAMP 16S MS con cepa vacunal MS-H y falsos negativos PCR y LAMP <i>vlhA</i> con MS-H.	104
7	Resultados de la prueba inicial de amplificación LAMP con cepas vacunales de MG y MS. a) Referencia <i>NewEngland BioLabs</i> , b) Amplificación LAMP con cepas vacunales de MG y MS. Izquierda controles negativos con agua, centro controles positivos y derecha controles negativos con ADN distinto a la secuencia de oligonucleótidos.	105
8	Amplificación LAMP exitosa con ARNr 16S y 23S en muestras de campo de Sinaloa y Sonora. a) Extremo izquierdo controles negativos con agua, tubos superiores e inferiores con muestras positivas a MG y extremo derecho controles positivos con ADN de cepa vacunal TS11; b) ejemplo de viraje de color a amarillo con muestras positivas a MS en tubos del inferior y muestras negativas color rosa en parte superior.	109
9	Electroforesis en gel de agarosa que muestra fragmentos de amplificación de los genes ARNr 16S y 23S. El carril 1 muestra una escalera de 100-1000 pb y los otros carriles corresponden a muestras de campo MG- (a) y MS-positivas (b), donde las bandas más intensas se consideraron candidatas para la secuenciación. Ejemplos de	

10	contraste de color LAMP en muestras de campo MG (c) y MS (d), con color rosa (negativo) y amarillo o ámbar (positivo).	110
	Árbol filogenético de los tres organismos secuenciados MG (a), MS (b) y GA (c).	112

RESUMEN

Identificación y ocurrencia molecular de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* en aves domésticas

Miguel Ángel Cháidez Ibarra

Los micoplasmas son bacterias sin pared celular con una amplia distribución ambiental y de hospedadores que comparten $\geq 97\%$ de identidad de ADN entre sus cepas y pueden persistir mucho tiempo en el huésped sin ser detectadas por el sistema inmune. En las aves domésticas, las principales especies patógenas de *Mycoplasma* son *Mycoplasma gallisepticum* (MG) y *Mycoplasma synoviae* (MS) y están incluidas en la lista de la OMSA, aunque MG es la especie patógena más significativa económicamente. El objetivo de éste trabajo fue realizar un metanálisis (MA) para estimar la ocurrencia molecular de la infección por MG y MS en aves domésticas en el mundo y un monitoreo en aves ligeras comerciales para detección molecular de MG y MS en México. Para el MA buscamos en seis bases de datos electrónicas para encontrar publicaciones sobre la detección molecular de MG y MS en aves domésticas y realizamos análisis de subgrupos por subpoblaciones de aves y regiones OMS. Para la detección molecular a nivel local en granjas de ponedoras comerciales de Sinaloa y Sonora, se analizaron 89 muestras de hisopos traqueales mediante LAMP y PCR convencional usando los genes ARNr 16S y 23S y *mgc2* para MG y ARNr 16S y *vlhA* para MS. En el MA se estimó a nivel mundial una ocurrencia de 38.4% [23.5-54.5] para MS y de 27.0% (IC 95% [20.4-34.2]) para MG; MS y MG fueron más frecuentes en reproductoras y ponedoras (62.6% y 31.2%, respectivamente) que en la avicultura diversa, así como en África subsahariana (MS) y en el sur de Asia (MG). El presente estudio detectó la presencia de MG en un 33.31% y MS en un 20.96% por LAMP y PCR en aves ligeras ponedoras del noroeste de México. Se identificaron infecciones mixtas de MG y MS en un 7.87 y 8.99% de los casos con PCR y LAMP, respectivamente. No se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) entre ambas especies de *Mycoplasma*. Nuestro estudio reveló una alta ocurrencia de MS y MG, tanto a nivel mundial como a nivel local y justifica la necesidad de una detección temprana para reducir la propagación de ambos *Mycoplasmas*.

Palabras clave: *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, ocurrencia, detección molecular, aves domésticas

ABSTRACT

Molecular identification and occurrence of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in poultry

Miguel Ángel Cháidez Ibarra

Mycoplasmas are cell-wall-less bacteria with a wide host and environmental distribution that share $\geq 97\%$ DNA identity among their strains and can persist for a long time in the host undetected by the immune system. In poultry, the main pathogenic species of *Mycoplasma* are *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and *Mycoplasma synoviae* (MS) and both are included in the WOAHP list, although MG is the most economically significant pathogenic specie. The aim of this work was to perform a meta-analysis (MA) to estimate the molecular occurrence of MG and MS infection in poultry worldwide and to monitor commercial light birds for molecular detection of MG and MS in Mexico. For MA we searched six electronic databases to find publications on molecular detection of MG and MS in poultry and performed subgroup analyzes by bird subpopulations and WHO regions. For molecular detection at the local level in commercial layer farms from Sinaloa and Sonora, 89 tracheal swab samples were analyzed by LAMP and conventional PCR using the 16S, 23S rRNA and *mgc2* genes for MG, and 16S rRNA and *vlhA* genes for MS. In MA, a worldwide occurrence of 38.4% [23.5-54.5] was estimated for MS, and 27.0% (95% CI [20.4-34.2]) for MG; MS and MG were more frequent in breeders and layers (62.6% and 31.2%, respectively) than in diverse poultry, as well as in sub-Saharan Africa (MS), and in South Asia (MG). The present study detected the presence of MG in a 33.31% and MS in a 20.96% by LAMP and PCR in light laying birds from northwestern Mexico. Mixed MG and MS infections were identified in 7.87 and 8.99% of the cases with PCR and LAMP, respectively. No significant difference ($p < 0.05$) was found among both *Mycoplasma* species. Our study revealed a high occurrence of MS and MG, both worldwide and locally, and justifies the need for early detection to reduce the spread of both *Mycoplasmas*.

Keywords: *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, occurrence, molecular detection, poultry

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 INTRODUCCIÓN

Durante 2022, la producción mundial proyectada de carne de aves es de 138.8 millones de toneladas, lo que representa un aumento del 0.6% con respecto a 2021; esta proporción de carne de aves domésticas representa el 38.5% de la producción mundial de carne, seguida de la carne de cerdo y de res (FAO, 2022). En el mundo, se estima que la población avícola es de aproximadamente 37.2 mil millones de aves y nueve países (EUA, China, Indonesia, Brasil, Pakistán, Irán, India, México y Rusia) incluyen el 63.0% de esta población (FAOSTAT, 2022). Por lo tanto, la producción avícola es una fuente fundamental de proteína animal y una importante actividad económica para algunos países y regiones del mundo. Las enfermedades respiratorias representan un desafío importante para la industria avícola, ya que las infecciones subclínicas y clínicas causan pérdidas sustanciales de producción. Las infecciones únicas o mixtas por virus de la bronquitis infecciosa (IBV), metapneumovirus aviar (aMPV), *Mycoplasma gallisepticum* (MG) y *Mycoplasma synoviae* (MS) pueden causar una mortalidad significativa, escasa ganancia de peso corporal, deficiente eficiencia de conversión alimenticia y aumento de los decomisos de canales en aves de tipo cárnico, así como caídas en la producción y calidad de huevos en aves ponedoras y reproductoras (Ball, Forrester & Ganapathy, 2018).

Los micoplasmas son bacterias sin pared que tienen una amplia distribución ambiental y de hospedadores (Bradbury, 2005). Estas bacterias patógenas contienen un pequeño genoma de 0.58-2.20 Mb que comparten $\geq 97\%$ de identidad de ADN entre sus cepas

(Thompson *et al.*, 2011) y pueden persistir durante mucho tiempo en el huésped, sin ser detectadas por el sistema inmunológico (Matyushkina *et al.*, 2016).

MG es el patógeno micoplásmico de aves domésticas más agresivo y económicamente significativo (Ley, 2008) que causa pérdidas anuales estimadas superiores a \$780 millones (Hennigan *et al.*, 2012). MS ha sido considerada tradicionalmente como la segunda especie de micoplasma aviar más importante de aves comerciales desde el punto de vista clínico y económico (Feberwee *et al.*, 2009), fue incorporada en 2008 a la sexta edición del manual de pruebas de diagnóstico y vacunas para animales terrestres de la Oficina Internacional de Epizootias (Organización Mundial de Sanidad Animal [OIE], 2008) y actualmente ocurre con mayor frecuencia en el mundo que MG (Chaidez-Ibarra *et al.*, 2021). La infección por MS se presenta con frecuencia como una enfermedad subclínica de las vías respiratorias superiores, aunque puede causar aerosaculitis o sinovitis grave cuando se producen coinfecciones con otros patógenos virales o bacterianos (Kleven *et al.*, 1972).

Se requiere un método de diagnóstico rápido para el control efectivo de la diseminación de la micoplasmosis aviar (Ehtisham-ul-Haque *et al.*, 2017); sin embargo, las herramientas de diagnóstico convencionales, como la serología y el cultivo, son insuficientes para monitorear de manera efectiva las infecciones avícolas (Ehtisham-ul-Haque *et al.*, 2018). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica para MG y MS permite una detección rápida, específica y sensible de micoplasmosis en casos sospechosos (Kamble *et al.*, 2015).

El objetivo del presente trabajo fue resumir la literatura disponible para estimar con un metanálisis la ocurrencia molecular de la infección por MG y MS en aves domésticas en

el mundo y evidenciar la presencia de MG y MS por detección molecular en aves ligeras comerciales en México.

1.2 REVISIÓN DE LITERATURA

El micoplasma infecta aproximadamente el 90% de las aves ponedoras de huevos de Estados Unidos (EUA), con pérdidas estimadas en \$140 millones anuales por reducción de la producción de huevos. En un solo brote de MG en pollos se han reportado pérdidas de hasta \$750,000 dólares (Jarquin *et al.*, 2009).

Los micoplasmas pertenecen a la división Firmicutes, a la clase *Mollicutes* (*mollis* = suave y *cutes* = pared), orden Mycoplasmatales, familia Mycoplasmataceae, género Mycoplasma. Los *Mollicutes* son los procariotas autorreplicantes más pequeños sin pared celular (Organización Mundial de Sanidad Animal [OIE], 2008). Se han aislado y caracterizado más de 20 especies de micoplasmas a partir de fuentes aviares, aunque sólo cuatro especies de micoplasmas aviares causan pérdidas económicas en la producción comercial de aves domésticas (Khan *et al.*, 2003). Las cepas patógenas MG y MS están incluidas en la lista de la OIE (Beyliefeld *et al.*, 2018). Entre éstos organismos más simples autorreplicantes que se conocen, MG es la especie patógena más significativa económicamente (Agüero-Fernández, Potter & Pérez-Casal, 2018). Sin embargo, la ocurrencia de MS ha aumentado en los últimos años en los países europeos (Moronato *et al.*, 2018). Las infecciones con MS se han reportado en los últimos años como endémicas en la industria avícola de muchos países del mundo, donde causan pérdidas económicas considerables a los reproductores pesados, pollos y gallinas (Moreira *et al.*, 2017). Las cepas más patógenas de MS son del genotipo F aislado del oviducto y del genotipo C aislado del tracto respiratorio (Kursa, Tomczyk & Sawicka, 2019).

Los hábitats primarios de los micoplasmas son los epitelios respiratorios, urogenitales o de las membranas serosas (Gautier-Bouchardon *et al.*, 2018). Se considera que MG es principalmente un patógeno de superficie del tracto respiratorio y la conjuntiva, aunque produce infecciones sistémicas transitorias, lo que provoca enfermedades agudas y crónicas en múltiples sitios (Ley, 2008). La mayoría de los micoplasmas tienden a ser específicos para el hospedador, aunque ciertas especies de micoplasmas aviares como

MG y MS se han encontrado en diferentes órdenes de aves (Michiels *et al.*, 2016). Un ave infectada con MG, a menudo permanece infectada de por vida y actúa como portadora de la infección para otras aves silvestres e instalaciones (Dhondt *et al.*, 2014). Aunque MG se considera la causa principal de enfermedad respiratoria crónica (ERC), otros organismos con frecuencia causan complicaciones. La infección por MG suele afectar a casi todas las aves de una parvada, pero la enfermedad es variable en gravedad y duración. Tiende a ser más severa y de mayor duración en los meses fríos y afecta más severamente a las aves más jóvenes que a las adultas, aunque puede haber una pérdida considerable por la disminución de la producción de huevos en las parvadas de postura (Ley, 2008).

Las estrategias para la contención eficiente de la infección por micoplasma requieren en primera instancia identificar qué aves representan un riesgo para otras aves (Michiels *et al.*, 2016) y demostrar las regiones o países donde MG y MS tienen más alta ocurrencia; de esta forma se pueden identificar áreas de atención prioritaria en las cuales enfocarse para disminuir la ocurrencia global y el potencial riesgo de infección a poblaciones sanas, principalmente en aquellas regiones con alta producción.

1.2.1 Importancia del segmento avícola. La carne y huevo de aves domésticas se han convertido en componentes dietéticos esenciales a nivel mundial y existe una gran demanda creciente de productos avícolas (AVEC, 2014). La población avícola mundial en 2022 es de unos 37.2 mil millones y nueve países (Estados Unidos 24.8%, China 13.0%, Indonesia 9.6%, Brasil 4%, Pakistán 3.9%, Irán 2.7%, India 2.1%, México 1.6%, y Rusia 1.3%) concentran cerca del 63% de la población avícola (FAOSTAT, 2022). La producción mundial de carne se pronosticó en alrededor de 360.1 millones de toneladas en 2022, de las cuales la carne de pollo participó con 38.5% (138.8 millones de toneladas), superando a la carne de cerdo con 3.9% (FAO, 2022).

Los principales países productores de pollo (millones de toneladas proyectadas para 2022) son China (24.2), EUA (23.7), Brasil (15.2), Rusia (4.8), Indonesia (3.9), India (3.8), México (3.8) y Turquía (2.5) (FAO, 2022). Los principales países productores de huevo (millones de cajas en 2020) a nivel mundial son China (1,136.4), India (270.2), EUA (263.6), Brasil (146.0), México (132.9), Rusia (123.0) y Japón (119.7) (UNA, 2022).

A pesar del enorme crecimiento en el sector avícola, la producción avícola se ve obstaculizada por numerosos factores, siendo la enfermedad uno de los principales, causando una alta morbilidad y mortalidad. En las aves domésticas, los micoplasmas son la principal causa de enfermedad crónica respiratoria (Umar *et al.*, 2017). A nivel mundial, *Mycoplasma gallisepticum* (MG) y *M. synoviae* (MS) se consideran las principales especies patógenas de micoplasma que afectan a las aves. Estos patógenos no solo causan un problema de salud, sino que también inducen pérdidas productivas y económicas significativas asociadas con una disminución en la producción de huevos, un crecimiento reducido y una mayor incidencia de decomisos en las plantas procesadoras (Shoaib, 2019).

1.2.2 Aspectos regulatorios, control y ocurrencia de micoplasmosis. La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) elaboró en 2005 la primera lista única de enfermedades de declaración obligatoria para animales terrestres y acuáticos para sustituir a las antiguas Listas A y B y otorgar a todas las enfermedades que formen parte de la lista el mismo grado de importancia en el comercio internacional. Para el año 2018, la lista OIE incluyó 117 enfermedades, infecciones e infestaciones animales, donde figuran MG y MS entre las 13 enfermedades e infecciones aviares de la lista (OIE, 2019), aunque MS fue añadida hasta 2008 a la sexta edición del Código Sanitario para los Animales Terrestres (OIE, 2008).

En EUA, las pautas del Plan Nacional de Mejora Avícola recomiendan estrategias regulares de vigilancia e intervención para contener las infecciones por MG y garantizar las poblaciones de aves libres de micoplasma (Hennigan *et al.*, 2012), que incluye eliminación de parvadas de reproductores de pollo infectadas por MG y MS (Jarquin *et al.*, 2009). En México existen la Ley Federal de Sanidad Animal (LFSA, 2007) y la Ley Federal sobre Metrología y Normalización (LFMN, 1999) entre las Leyes y Reglamentos Federales. La dependencia federal SAGARPA tiene dentro del Comité Consultivo Nacional de Normalización Agroalimentaria, al subcomité de Protección Zoosanitaria que es la dependencia normalizadora que expide las Normas Oficiales Mexicanas (regulaciones técnicas) de observancia obligatoria (SENASICA, 2019). Sin embargo, en México no existe legislación respecto a MG y MS en las 27 Normas Oficiales Mexicanas (NOM) vigentes ni en las 22 NOM canceladas. La situación de micoplasmosis aviar (MG

y MS) para México está como enfermedad limitada a cierta (s) zona(s)/región del país en la base de datos del sistema mundial de información zoonosológica (WAHIS Interface) – Versión 1 (OIE, 2019b).

Sin una pared celular, los micoplasmas no se ven afectados por muchos antibióticos (β -lactámicos, glucopéptidos y fosfomicina) que se dirigen a la síntesis de la pared celular; además, son intrínsecamente resistentes a las sulfonamidas, quinolonas de primera generación, trimetoprim, polimixinas y rifampicina, donde la resistencia más alta se observa para macrólidos, seguidos de tetraciclinas, mientras que las pleuromutilinas son antibióticos efectivos *in vitro* y la mayoría de sus mecanismos de resistencia son mutaciones puntuales en su cromosoma debido a que los micoplasmas no albergan plásmidos y pocos mecanismos están asociados con un transposón (Gautier-Bouchardon, 2018). La dosis recomendada de valnemulina (un derivado de antibiótico de pleuromutilina semisintético) es de 6.5 mg/Kg diarios durante 3 días para tratar pollos infectados por MG (Xiao *et al.*, 2015). La administración de tilmicosina (TLM, 7.5 mg/Kg), clortetraciclina (CLT, 10 mg/Kg), doxiciclina (DC, 10 mg/Kg) y enrofloxacin (ENR, 10 mg/Kg) después de 2 rondas de tratamiento intensivo con antibióticos [semana (sem) 11 y 12 CLT/DC/ENR, luego sem 22 a 33 DC/ENR/TLM] erradicó MS de una parvada positiva de reproductores de pollos de edades múltiples. TLM se administró de forma continua a través de agua potable cada 6 semanas a partir de la sem 33. El costo total de la terapia con antibióticos fue de 64,553 USD (1.321 USD / ave) (Hong *et al.*, 2015). La vacunación contra MG o MS puede ser una solución útil a largo plazo en situaciones en las que no es posible mantener las parvadas libres de infección, especialmente en sitios de producción de huevos comerciales de edades múltiples (Kleven, 2008). Hay 3 vacunas comerciales (inactivadas, vivas y recombinantes) de MG que se han utilizado para el programa de prevención en aves. Las bacterinas generalmente contienen un adyuvante de emulsión de aceite y pueden reducir la disminución en la producción de huevos, aunque no previenen la infección. Hay 4 tipos de vacunas MG vivas disponibles, la cepa F-Conn (MG-F), TS-11, 6/85 y MG-70 (Machado *et al.*, 2017). La cepa F vacunal gana virulencia a través de múltiples pasajes de aves, por lo que se requiere prevenir su transmisión a parvadas no vacunadas (Gharaibeh *et al.*, 2011). Las vacunas TS-11 y 6/85 mostraron una capacidad similar para proteger a los pollos infectados de los signos,

aunque TS-11 se desempeñó ligeramente mejor contra la enfermedad clínica y ambas vacunas proporcionaron una protección no específica contra el desafío del virus de bronquitis (Bwala *et al.*, 2018). La cepa vacunal MS-H sensible a la temperatura (ts (+)) es la única vacuna viva MS atenuada disponible comercialmente para uso en aves (Shahid *et al.*, 2014), esta cepa no crece a la temperatura corporal central de las aves, coloniza solo el tracto respiratorio superior y establece una sólida protección contra MS de campo y se usa para la vacunación de aves comerciales en 26 países diferentes en 6 continentes (Zhu *et al.*, 2018).

Las infecciones por MS en granjas avícolas comerciales (reproductoras y ponedoras) son predominantes (23.61%) en comparación con MG (6.43%) en diferentes estados de la India (Giram *et al.*, 2022). La infección por MG es muy común y grave en China (75.04%), especialmente en coinfección por MS (45.6%) (Wei *et al.*, 2022), mientras que MS se identificó en China central con una tasa del 50% (Sui *et al.*, 2021). En Irán, hubo una baja prevalencia de MG (0.34%) en las parvadas de aves comerciales de la provincia de Khouzestan, mientras que MS tuvo una alta prevalencia (24.8%), con amplia distribución (72%) entre las parvadas de ponedoras (Gharibi, Ghadimipour, & Mayahi, 2018). En Europa occidental, se encontró una baja prevalencia de MG en gallinas, pollos y pavos de carne y una alta prevalencia de MS en pollos (Michiels *et al.*, 2016), mientras que en el sur de Italia la ocurrencia global fue del 12.5% para MG y del 23.25% para MS en gallinas ponedoras (Galluzzo *et al.*, 2022) y en la Federación de Rusia, la micoplasmosis aviar se detectó mediante anticuerpos específicos contra MG (0.58%) y MS (12.64%) en muestras de suero de 31 granjas avícolas en 2019 (Menshchikova *et al.*, 2020). En dos rastros con servicios de inspección federal de Brasil, la incidencia acumulada fue de 7.02% para MG y de 35.09% para MS en lotes de pollos de engorde (Dos Santos *et al.*, 2021).

1.2.3 Mecanismos de patogenicidad. MG es un microorganismo exigente debido a la falta de varios genes esenciales para la síntesis de nutrientes y por ello depende parcialmente de su hospedador para su supervivencia (Majumder & Silbart, 2016). A excepción de las infecciones adquiridas por transmisión del huevo, las vías respiratorias superiores y/o la conjuntiva son las puertas de entrada para las infecciones por MG adquiridas naturalmente (Ley, 2008). Las proteínas unidas a la membrana de MG, GapA

y CrmA, son factores clave de virulencia desde la adherencia hasta la colonización, así como el inicio y la gravedad del desarrollo de lesiones en el epitelio traqueal (Rüger, Szostak & Rautenschlein, 2022). Tras la invasión de las células eucariotas, se produce una transición de fase (cambios a nivel proteómico, genómico y metabólico) del patógeno aviar MG, incluida la proteína reguladora SpxA como un regulador importante para la adaptación de MG a un entorno intracelular (Matyushkina *et al.*, 2016). Esta capacidad de invasión de células no fagocíticas contribuye a la diseminación sistémica de MG desde el tracto respiratorio hasta los órganos internos (Vogl *et al.*, 2008). Además, los subproductos del micoplasma, como el peróxido de hidrógeno y los radicales superóxido, junto con las citocinas inflamatorias pueden exacerbar la enfermedad (Umar *et al.*, 2017). También, los micoplasmas tienen enzimas (cisteína proteasa CysP) que pueden escindir la IgG del huésped como estrategia para una supervivencia prolongada a pesar de la respuesta de anticuerpos de su huésped (Cizelj *et al.*, 2011).

Como respuesta de defensa inmune de las células de fibroblastos y pulmonares embrionarias de pollo contra la invasión de MG, hay una sobreexpresión del ácido microrribonucleico (miARN) *gga-miR-451* que disminuye la expresión de la proteína de activación de tirosina3-monooxigenasa/triptófano5-monooxigenasa zeta (YWHAZ) en tejidos y células infectados con MG, lo que reduce la secreción de citocinas inflamatorias e inhibe la progresión del ciclo celular y la proliferación celular y promueve la apoptosis celular (Zhao *et al.*, 2018).

En el proceso de invasión y persistencia para adaptarse a las condiciones intracelulares, MG aumenta las vías metabólicas para acelerar la síntesis de energía y reduce la biosíntesis. Los cambios a nivel genómico incluyen polimorfismos de un solo nucleótido (PNS) en los genes lipoproteínas y hemaglutininas variables (*vIhA*) (principalmente en el cluster 4 en la región de codificación), el proteoma se reorganiza aumentando 2-4 veces las proteínas con actividad oxidoreductasa y protección contra el estrés oxidativo y las proteínas reguladora SpxA y también varían los antígenos de superficie VhA para un repertorio más diverso. En la reorganización metabólica disminuye la concentración de ATP intracelular por acumulación de enzimas glucolíticas (fosfato de dihidroxiacetona, DHAP), con mayor uso de glicerol o glicerofosfodiésteres como fuente de energía, que inevitablemente resulta en una mayor producción de peróxido de hidrógeno endógeno

ante el cual las bacterias activan un sistema para regular y protegerse contra el estrés oxidativo (aumento de NADH-oxidasa, que utiliza oxígeno molecular como aceptor de electrones y también produce peróxido de hidrógeno como producto secundario) (Matyushkina *et al.*, 2016).

Los micoplasmas evaden el sistema inmune del huésped a través de mutaciones frecuentes que dan como resultado un cambio de marco y una variación de fase para ciertos grupos de proteínas (Ricketts *et al.*, 2017). Las proteínas inmunodominantes codificadas por la familia de genes de lipoproteína variable y hemaglutinina (*vlhA*) son importantes para la interacción MG-huésped, la patogénesis y la evasión inmune, con variación dinámica de fase de *vlhA* en las primeras etapas de la infección, siendo *vlhA* 3.03 predominantemente expresado durante la infección inicial (Pflaum *et al.*, 2018). Las adhesinas antigénicamente variables (secuencias de *VlhA* adyacentes al promotor) de MS varían en la avidéz por la citoadherencia y constituyen un mecanismo conservado para unirse al ácido siálico de los receptores de las células huésped (May *et al.*, 2014). Los factores que median la virulencia de MG incluyen la citoadherencia, la actividad sialidasa, la producción de peróxido y la formación de biopelículas, con variación entre cepas para los tres primeros factores, pero sin diferencias en la densidad de las biopelículas, aunque todas las cepas pueden unirse al ácido siálico unido a alfa-2,6 (Perez *et al.*, 2020). Se han asociado 10 genes (MGA_0128, MGA_0165, MGA_0209, MGA_0358, MGA_0508, MGA_0655, MGA_0689, MGA_0704, MGA_0884 y MGA_0974) en MG con la formación de biopelícula y pueden estar implicados en la persistencia de la infección (Wang *et al.*, 2017).

Los mecanismos patógenos incluyen la adherencia a las células diana del huésped, la liberación de toxinas, la mediación de la apoptosis y la evasión inmunitaria que conduce a la obstrucción de la luz traqueal, la exfoliación de las células epiteliales y la ciliostasis, que pueden exacerbar las condiciones de la enfermedad por los subproductos del micoplasma, como el peróxido de hidrógeno y los radicales superóxido, junto con las citocinas inflamatorias (Umar *et al.*, 2017). Los eventos moleculares y celulares que conducen al desarrollo de lesiones parecen ser el resultado del daño indirecto de las respuestas inflamatorias y celulares del huésped (Bradbury, 2005). La patogenicidad causada por MG en los pinzones domésticos está mediada principalmente por las

respuestas inmunes proinflamatorias del huésped, ya que las cepas más patógenas (NC2006) desencadenan señalización de citocinas inflamatorias locales más fuertes, con un pico de expresión de citocinas 3-6 días postinfección (Vinkler *et al.*, 2018).

Algunos determinantes genómicos de la virulencia en MG son proteínas relacionadas con la citoherencia y genes involucrados en el metabolismo del azúcar, incluidos los genes de lipoproteínas de superficie *vlhA* y al menos 16 genes ausentes o significativamente fragmentados en la cepa F vacunal de MG (Szczepanek *et al.*, 2010). La citoadherencia a las superficies epiteliales de las células del huésped es un requisito para una colonización exitosa, de este modo MG se adhiere al epitelio respiratorio mediante una estructura de punta especializada, considerada necesaria para la invasión de las células. Los mecanismos moleculares en la citoadherencia de MG incluyen una acción coordinada entre la citoadhesina primaria GapA y la molécula CrmA relacionada con citoadherencia (Papazisi *et al.*, 2003). Las proteínas GapA y CrmA son críticas en el proceso de adhesión, así como en el desarrollo posterior de la enfermedad (Agüero-Fernández, Potter & Pérez-Casal, 2018). Éstas proteínas específicas de citoadherencia GapA y CrmA de MG participan en la motilidad por deslizamiento y hemadsorción (Indikova *et al.*, 2014).

MG orquesta el desbalance inmune que conduce al reclutamiento y activación prolongada de células inflamatorias en la mucosa respiratoria y desencadena una infección crónica (Beaudet *et al.*, 2017). Además de las respuestas inflamatorias complejas inducidas por la infección por MG, la generación de estrés oxidativo exagera aún más la enfermedad, contribuyendo al desarrollo temprano de enfermedades respiratorias crónicas que conducen a dificultad respiratoria en aves (Vogl *et al.*, 2008). La infección por MG aumenta el nivel sérico y en los tejidos pulmonares de las citocinas inflamatorias IL-1 β , TNF- α , IL-8 e IL-6 y afecta la integridad estructural de los tejidos de la mucosa del ave (Manafi *et al.*, 2015), que induce una respuesta inflamatoria grave en los pulmones por estrés oxidativo, aumento de citocinas séricas y expresión de ARNm y proteínas de genes inflamatorios y reducción de las actividades de ATPasa y de expresión de genes relacionados con el metabolismo energético (Ishfaq *et al.*, 2020).

La capacidad de invasión celular de la cepa MG R-*low*, que puede sobrevivir y multiplicarse intracelularmente durante al menos 48 horas (h), contribuye a la

diseminación sistémica desde el tracto respiratorio hasta los órganos internos (Vogl *et al.*, 2008). Los patrones de polimorfismos de los genes *pMGA* y *pvpA* se consideran factores de virulencia para la infección por MG (Faisal *et al.*, 2011). La proteína enolasa (MsEno) de MS tiene capacidad de unión con las proteínas plasminógeno de pollo (PIg) y fibronectina humana (Fn), por lo que podría afectar la infección por adherencia a células y la inmunidad (Bao *et al.*, 2014). Un importante factor de virulencia de MG es una nucleasa termoestable citotóxica (lipoproteína putativa *MGA_0676*) localizada en la superficie de la membrana con una región esencial para la translocación nuclear y la inducción de apoptosis y daños patológicos en células de pollo (Xu *et al.*, 2015). Los micoplasmas tienen enzimas cisteína proteasas CysP, que pueden escindir la IgG del huésped en el fragmento de unión a antígeno (Fab) y en el fragmento de región cristalizante (Fc) y esta estrategia utilizada por MG y MS les permite una supervivencia prolongada a pesar de la respuesta de anticuerpos del huésped (Cizelj *et al.*, 2011). Los efectos de MG sobre el desempeño y la fisiología de la gallina ponedora comercial varían en relación con la cepa de MG y la edad del ave al momento del desafío. El desafío durante la postura pospico con la cepa S6MG puede tener un efecto mayor en las gallinas que antes o al inicio de la postura (Peebles & Branton, 2012). Las aves infectadas por enfermedad crónica respiratoria causada por MG muestran estornudos, estertores, tos y exudados de las fosas nasales y los ojos. Los exudados catarrales en el pasaje nasal y la tráquea, la acumulación de material caseoso en los pulmones y en los sacos aéreos son lesiones comunes (Gondal *et al.*, 2015). Además de hemorragias del epitelio traqueal, hay hemorragias aparentes en los pulmones color rojizo oscuro y sacos aéreos turbios. En particular, la forma patomórfica típica del ovario con forma de coliflor en la mayoría de las gallinas es notable, además de las hemorragias en el oviducto (Abbas *et al.*, 2018). Las lesiones articulares en cojeras típicamente unilaterales por MS incluyen artritis y sinovitis que afectan la articulación del corvejón y las almohadillas plantares (Moreira *et al.*, 2014).

1.2.4 Opciones de diagnóstico para Mycoplasma. Se puede esperar un cierto nivel de resultados falsos positivos en cualquier prueba serológica y no es recomendable confiar completamente en una sola prueba (Feberwee *et al.*, 2005). Varias pruebas serológicas utilizadas para detectar anticuerpos contra MG o MS tienen variaciones en la

especificidad y la sensibilidad y no son suficientes por sí solas para la detección de la micoplasmosis aviar (Organización Mundial de Sanidad Animal [OIE], 2008). Por otra parte, los métodos de detección basados en cultivo son muy lentos, pues requieren hasta 28 días (Lehmann *et al.*, 2010). Las técnicas de cultivo son laboriosas, lentas, costosas y requieren condiciones estériles (Ferguson-Noel & Williams, 2015). El cultivo representa el estándar de rendimiento para la detección directa del organismo, pero MG es un organismo de crecimiento lento y relativamente delicado que requiere una o más semanas para su crecimiento e identificación. En algunos casos, el aislamiento de MG no tiene éxito como resultado del crecimiento excesivo del cultivo de micoplasmas saprófitos que habitan en el tracto respiratorio superior, particularmente en parvadas de gallinas comerciales más adultas. A diferencia de las técnicas de aislamiento, que requieren mucho tiempo y pueden ser problemáticas, la principal ventaja del método reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es que es rápido y sensible para detección directa del ácido nucleico del organismo en hisopos (García *et al.*, 2005).

1.2.5 Métodos de extracción utilizados en pruebas moleculares. La purificación de ADN y ARN de una fuente de muestra determinada generalmente se produce mediante un proceso de dos pasos: (1) liberación de ácido nucleico a través de lisis celular y orgánulos, seguida de (2) purificación de los ácidos nucleicos "liberados" del lisado (Ruggieri *et al.*, 2016).

La lisis emplea técnicas que rompen eficazmente las membranas celulares abiertas (envoltura nuclear, membrana externa y pared celular si están presentes) mientras que desactivan eficazmente las nucleasas presentes en el lisado. Normalmente, la lisis se clasifica en tres categorías: química, enzimática y mecánica (Ruggieri *et al.*, 2016). La lisis celular es el paso fundamental para la extracción de ADN y se han reportado muchos métodos. Los métodos físicos comúnmente utilizados incluyen ciclos de congelación-descongelación, ciclos de congelación-ebullición, sonicación, homogeneización en molino de perlas, calentamiento por microondas, molienda en molino de mortero y ebullición (Barbosa *et al.*, 2016), mientras que dodecil sulfato de sodio (SDS) y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) son las sustancias químicas más utilizadas y el método biológico generalmente se refiere al uso de proteinasa K (Barbosa *et al.*, 2016).

La lisis química incluye el uso de detergentes [Triton X-100 y dodecilsulfato de sodio (SDS)], sales caotrópicas [perclorato de sodio y cloruro de guanidinio (tienen la ventaja adicional de inactivar las enzimas celulares, incluidas las nucleasas y pueden evitar la degradación del ADN y el ARN)], fenol y otros disolventes orgánicos (Ruggieri *et al.*, 2016).

Los métodos de lisis enzimática emplean típicamente proteasas (proteínasa K, lisozima, lisostafina, zimoliasa) que desnaturalizan y degradan proteínas que interactúan con ácidos nucleicos facilitando el aislamiento de ADN y ARN al mismo tiempo que protegen de la digestión por nucleasas (Ruggieri *et al.*, 2016).

La lisis mecánica implica el uso de métodos para romper físicamente células y compartimentos intracelulares. Estos métodos se utilizan con mayor frecuencia para muestras difíciles de lisar (bacterias, hongos, plantas/semillas, insectos) que son refractarios a la mayoría de los otros métodos de lisis químicos y enzimáticos (Ruggieri *et al.*, 2016). También se pueden usar muestras de trituración física después de congelarlas con nitrógeno líquido para asegurar la ruptura de las paredes celulares sin exponer los ácidos nucleicos a nucleasas activas (Murray & Thompson, 1980).

Después de lisar (homogeneizar) una muestra, el ácido nucleico deberá purificarse del lisado y separarse de otras moléculas biológicas (lípidos, proteínas y carbohidratos), así como de los compuestos utilizados para generar el lisado (tensioactivos, sales, enzimas) (Ruggieri *et al.*, 2016).

Las técnicas de separación de fases que utilizan fenol-cloroformo o extracción con tiocianato de guanidinio ácido-fenol-cloroformo (Tri-Reagent® o Trizol®) y técnicas de separación en columna (que cuentan con un portador de intercambio aniónico o sílice en fase sólida) son los métodos más prevalentes en uso para el aislamiento de ácidos nucleicos. En la extracción en fase orgánica de ácidos nucleicos con fenol y cloroformo el solvente orgánico-hidrofóbico contendrá lípidos y proteínas, los otros componentes celulares se asentarán en el fondo (interfase) de la capa acuosa que contiene los ácidos nucleicos (Ruggieri *et al.*, 2016).

Las fases acuosas y orgánicas son separadas por centrifugación y se usa comúnmente el etanol (o isopropanol) con acetato de amonio (o alguna otra sal iónica) para precipitar los ácidos nucleicos de la capa acuosa (Tan & Yiap, 2009). Estos productos químicos

ayudan a deshidratar el ácido nucleico, disminuyendo su solubilidad y provocando su precipitación (Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989). El enfriamiento de las muestras durante la precipitación de etanol en un baño de hielo puede ayudar a acelerar el proceso (Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989). El ácido nucleico se sedimenta mediante centrifugación, se lava con etanol y luego se resuspende en una solución baja en sal (generalmente agua o TE) antes de su uso en el análisis posterior (Ruggieri *et al.*, 2016). Sin embargo, el gran número de pasos de manipulación necesarios para la extracción por separación de fases orgánicas puede dar lugar a inconsistencias en el rendimiento y la pureza. Las extracciones orgánicas requieren el uso de solventes orgánicos altamente tóxicos, lo que requiere el uso de una campana extractora y prácticas adecuadas de eliminación de desechos (Price, Leslie & Landers, 2009).

En los métodos basados en partículas de sílice (separación basada en columnas), el uso de un agente caotrópico (cloruro de guanidinio) hace que los ácidos nucleicos se unan selectiva (y reversiblemente) a la sílice. Los complejos ligados a sílice-ácido nucleico se pueden lavar posteriormente con una solución de alcohol para eliminar los contaminantes y luego eluir los ácidos nucleicos con agua o TE (Boom *et al.*, 1990). El agente caotrópico deshidrata la columna vertebral del ácido nucleico permitiendo que el ácido nucleico interactúe con las partículas de sílice (Melzak *et al.*, 1996). Se forma un puente catiónico en el que los enlaces de hidrógeno en el agua y el oxígeno cargado negativamente en la sílice se rompen, creando así un evento de unión fuerte pero reversible (Tan & Yiap, 2009). Tras la adición de agua, se produce la rehidratación, invirtiendo la interacción y permitiendo la elución del ácido nucleico (Melzak *et al.*, 1996). Entre las empresas que ofrecen kits de purificación de ácidos nucleicos con esta tecnología se encuentran Zymo Research, Qiagen, Life Technologies (Price, Leslie & Landers, 2009).

Las extracciones basadas en columna de centrifugación están bien caracterizadas y son muy uniformes debido a la reducción de los pasos de manipulación en comparación con las extracciones con fenol-cloroformo (Price, Leslie & Landers, 2009). Permiten una purificación rápida y eficiente al sortear muchos de los problemas asociados con la separación de fases orgánicas, incluida la separación de fases incompleta y la molestia de trabajar con disolventes altamente tóxicos (Tan & Yiap, 2009).

El procedimiento de extracción tiene muy poca influencia en el resultado de la PCR (Liman *et al.*, 2014) y el método de ebullición es perfectamente adecuado para micoplasma por ser más rápido, sensible, simple, seguro y económico que el método de sílice y el fenol-cloroformo, evitando grandes pérdidas de material de la muestra durante el proceso de extracción y proporcionando una manipulación más segura, en comparación con el fenol (Mettifogo *et al.*, 2015). Como los micoplasmas carecen de pared celular, es posible utilizar métodos de extracción de ADN más sencillos, basados en choques térmicos o ruptura mecánica, para ser empleados en los ensayos de PCR. Aunque no se observa ninguna banda que indique la presencia de ADN porque se obtiene el ADN geonómico unido al material celular y a proteínas desnaturalizadas y por tanto no se encuentra totalmente expuesto para ser detectado en la electroforesis en gel de agarosa; sin embargo, se detecta el producto amplificado del material genético al realizar la PCR, por lo que no es necesario tener un ADN puro para que pueda ser detectado con oligonucleótidos que reconocen una región específica del ADN (Hernández *et al.*, 2009).

Pasos para la extracción de ADN por el método físico:

A partir de hisopos, previamente sumergidos (tres lavados sucesivos) en 1-1.5 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS), a 4 °C y centrifugados a 13,000-14,000 x g durante 20-30 min, se elimina el sobrenadante y el sedimento se disuelve en un volumen de elusión de 25-40 µL de agua desionizada estéril para luego hervir (95-100 °C en un baño de agua o 110 °C en un bloque seco durante 10-30 min) y aplicar después choques de frío (hielo o -20 °C durante 10 min). Posteriormente el lisado se centrifuga a 13,000-14,000 x g durante 2, 5 ó 10 min. El sedimento (desechos) se lava dos veces en PBS y el sobrenadante que contiene ADN se recoge en tubos Eppendorf con tapón de rosca de 1.5-2 mL para usar como molde en la reacción de amplificación y se almacena a -20 °C (Elbehiry *et al.*, 2016; Ghaniei *et al.*, 2016; Kahya *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2001; Rasoulinezhad *et al.*, 2017; Rauf *et al.*, 2013; Uddin *et al.*, 2016; Ventura *et al.*, 2012).

Pasos para la extracción de ADN por el método de fenol cloroformo:

Aproximadamente 500 µL de las muestras se colocan en un tubo Eppendorf de 1×5 µL (Roche Company, Alemania) y se centrifugan a 13,000-14,000 rpm durante 5-15 min. Luego, se añaden 100 µL de tampón de lisis a 100 µL de precipitado (sedimento), el tubo

se coloca en un baño a 56 °C durante cuatro h. Luego, se añaden 200 µL de fenol saturado y el tubo se centrifuga a (13,000 rpm o 15,700 x g) durante 20 min. El sobrenadante se transfiere a otro tubo y se añade un volumen igual de fenol/cloroformo mezclado (1:1). Después de centrifugar a 13,000 rpm durante 20 min, el sobrenadante se transfiere a otro tubo y se añade un volumen igual de cloroformo puro y luego se centrifuga a 13,000 rpm durante cinco min. El sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo, se mezcla con 1/10 de volumen de acetato sódico 3 M y se precipita con 2 veces el volumen de etanol puro a -20 °C durante 20 min. Luego, el tubo se centrifuga a 13,000 rpm durante 15 min, luego se agregan 200 µL de etanol al 70% y el tubo se centrifuga a 13,000 rpm durante cinco min, y finalmente el ADN se seca y se resuspende en 50 µL de tampón TE a 4 °C para ser utilizado para PCR (Pourbakhsh *et al.*, 2010; Tebyanian *et al.*, 2014).

Pasos para la extracción de ADN por el método con kit comercial (QIAamp® DNA mini kit, QIAGEN, Hilden, Alemania):

Siguiendo las recomendaciones del fabricante con éstas modificaciones: los hisopos se colocan en microtubos que contienen 180-200 µL de tampón ATL (tampón de lisis tisular; QIAGEN) y 10-20 µL de proteinasa K y se incuban a 56 °C durante 10-15 min. Después de la centrifugación, se añaden 200 µL de tampón AL (tampón de lisis; QIAGEN) y los microtubos se incuban a 70 °C durante 10 min. Después de la incubación, se añaden 200-210 µL de etanol al 100% al lisado. Las muestras de ácido nucleico precipitado se lavan y centrifugan siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ADN extraído se eluye con 100 µL de tampón de elución proporcionado en el kit (Amer *et al.*, 2019; Michiels *et al.*, 2016).

1.2.6 Métodos moleculares de diagnóstico. Hay una mayor tasa de detección con la técnica PCR en comparación con los procedimientos de cultivo clásicos para los patógenos bacterianos respiratorios más comunes en especímenes clínicos de aves (Ammar *et al.*, 2016). Por ello, el diagnóstico molecular es más preciso, rápido y eficiente para la identificación temprana de MG que las técnicas de cultivo convencionales (Rauf *et al.*, 2013), ya que la PCR específica para MG y MS es superior al aislamiento por cultivo y permite la detección rápida, específica y sensible de micoplasmosis en aves (Kamble *et al.*, 2015). La sensibilidad de la PCR permite la detección de agentes

patógenos en muestras clínicas tomadas de animales con infección subclínica o en tratamiento con antibióticos (Moreira *et al.*, 2017), incluso la PCR facilita la identificación de agentes de micoplasma a partir de muestras de cultivo contaminadas (Senthilnathan *et al.*, 2015). La PCR es capaz de detectar organismos viables, no viables o no cultivables y el ADN dañado y degradado puede servir como plantilla para la PCR (Hess *et al.*, 2007); además, la amplificación por PCR detecta una fracción tan baja como 10^{-6} picogramos de ADN del contenido cromosómico total de una célula de MG (Nascimento *et al.*, 1991) y el método PCR es capaz de detectar consistentemente 5.4×10^2 células de MG/mL (Nascimento *et al.*, 2005) o 4.7×10^2 unidades de cambio de color/mL de MS (Hong *et al.*, 2004). Traducido a número de organismos, 1 femtogramo de ADN de micoplasma es aproximadamente equivalente al ADN genómico de una sola célula de micoplasma, basado en un tamaño del genoma de aproximadamente 1000 Kb (Hammond *et al.*, 2009).

Debido a la estabilidad de las muestras de ADN, los hisopos traqueales se pueden transportar al laboratorio en forma "seca" sin medio de transporte (Lobova *et al.*, 2012). El almacenamiento de los hisopos secos con punta de algodón sin medio de transporte tanto a temperatura ambiente (21-23 °C) como en refrigeración a 4 °C es adecuado para la detección molecular de MG y MS, lo que tiene mayor influencia es el tipo de hisopo (se prefiere el eje de plástico al eje de madera) (Ball *et al.*, 2020). El ensayo de PCR se puede completar en un día utilizando un hisopo de mucosa seco transportado en un recipiente para evitar la contaminación cruzada entre las muestras (Lauerman *et al.*, 1993). Acumulativamente, se requieren 27 h para una PCR específica de MG, 24 h de las cuales son utilizadas para el enriquecimiento del cultivo para aumentar la sensibilidad, aunque el enriquecimiento no es necesario (Evans *et al.*, 2009).

La PCR es un método sensible para la detección de segmentos de ADN específicos; sin embargo, las posibles razones de baja eficacia son la inhibición de la actividad de la ADN-polimerasa debido a las influencias competitivas causadas por ADN extraño, como el ADN genómico que se origina en los tejidos y/o microorganismos, lo que conduce a resultados falsos negativos. Se requiere un control positivo interno (marcador que contiene una secuencia de ADN en parte idéntica al ADN diana) para evitar resultados de PCR falsos negativos (Szolgyenyi, Korbelt & Lenzbauer, 2002). El control positivo

interno se amplifica en todas las muestras y es útil para demostrar la ausencia de inhibidores de la PCR (los productos de PCR obtenidos del control positivo interno se pueden distinguir fácilmente de los obtenidos de las secuencias diana, ya que tienen diferentes longitudes de amplicón) (Hess *et al.*, 2007).

Existen muchas variaciones del método PCR, como el método amplificación isotérmica mediada en bucle (LAMP) que no requiere equipo especializado, es rápido y muy sensible y la PCR en tiempo real (RT-PCR) que permite acortar el tiempo para obtener resultados y detectar de manera efectiva material genético de MS (Kursa *et al.*, 2016).

1.2.6.1 Amplificación isotérmica mediada en bucle. Los métodos de amplificación que funcionan en condiciones isotérmicas se han desarrollado como alternativas a la PCR, no requieren ciclos térmicos, se pueden llevar a cabo utilizando equipos más simples y como resultado, son potencialmente más accesibles para su uso en lugares donde la instrumentación compleja y/o costosa no está disponible (Tomlinson, 2016). LAMP es una herramienta analítica fácil de usar en el campo, debido a sus tiempos de procesamiento rápidos e instrumentación simple, es una amplificación sólida, altamente sensible y específica del ADN objetivo, que se logra utilizando hasta seis oligonucleótidos, para diagnósticos y análisis de bajo costo (Becherer *et al.*, 2020). Es uno de los métodos con mayor potencial para la detección de patógenos, ya que es simple, reproducible y rentable, incluso en países en desarrollo que no pueden competir por la tecnología de ciclos térmicos para la PCR, pues después de una etapa inicial no cíclica, la amplificación cíclica y el alargamiento se realizan en menos de 1 h mediante ADN polimerasa (Liman *et al.*, 2014).

LAMP es una herramienta de diagnóstico económica y simple para la detección molecular de patógenos en animales, que amplifica un alto número de copias de ADN (10^9 - 10^{10} copias) en 30 a 60 min isotérmicamente a 63 °C y el producto amplificado se puede detectar mediante la visualización de la turbidez o la detección de fluorescencia (Ehtisham-UI-Haque *et al.*, 2018). LAMP es un método de amplificación de ácido nucleico simple, rápido, específico y rentable, con un sistema de detección visual simple para los resultados de la reacción LAMP (Tomita *et al.*, 2008). El método LAMP tiene la capacidad de sintetizar una cantidad extremadamente grande de ADN y se produce una gran cantidad de subproducto de la polimerización (ion pirofosfato), generando un precipitado

blanco de pirofosfato de magnesio en la mezcla de reacción, que permite distinguir visualmente la turbidez causada por el precipitado si el ácido nucleico fue amplificado. Por lo tanto, no se necesita ningún reactivo especial para detectar el ion pirofosfato, el único dispositivo necesario es un baño de agua que proporcione una temperatura constante de 65 °C (Mori *et al.*, 2001; Mori & Notomi, 2009).

LAMP utiliza dos oligonucleótidos externos (oligonucleótido externo directo, F3 y oligonucleótido externo inverso, B3), dos oligonucleótidos internos (oligonucleótido interno directo, FIP y oligonucleótido interno inverso, BIP) y ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de la hebra en un rango de temperatura óptimo entre 60 y 65 °C (Notomi *et al.*, 2000). LAMP puede acelerarse en un factor de dos mediante el uso de un par adicional de oligonucleótidos, los oligonucleótidos de bucle (oligonucleótido de bucle directo, LF, y oligonucleótido de bucle inverso, LB) (Nagamine *et al.*, 2002). Los productos finales forman estructuras parecidas a coliflores (tallos con múltiples horquillas/voladizos) (Wozniakowski *et al.*, 2011). LAMP genera productos de amplificación que contienen bucles. Los oligonucleótidos internos se dirigen a dos sitios de unión diferentes de orientaciones opuestas, de modo que el producto de extensión contiene autocomplementariedad y forma un bucle. Los oligonucleótidos de bucle no son esenciales para que proceda el mecanismo de amplificación, por lo que pueden diseñarse ensayos LAMP que carezcan de oligonucleótidos de bucle o que incluyan solo un oligonucleótido de bucle; sin embargo, los ensayos con dos oligonucleótidos de bucle generalmente amplifican el ADN diana en un período de tiempo más corto (Tomlinson, 2016).

LAMP requiere el uso de oligonucleótidos internos y externos, con la adición opcional de oligonucleótidos de bucle para acelerar la amplificación. Además, los oligonucleótidos internos (normalmente denominados FIP y BIP, los oligonucleótidos internos directo e inverso, respectivamente) constan cada uno de dos regiones de unión a molde, con las dos regiones en orientaciones opuestas. Las temperaturas de hibridación suelen oscilar entre 55 y 60 °C para F3/B3 (los oligonucleótidos externos), las regiones F2/B2 en los oligonucleótidos FIP/BIP y los oligonucleótidos de bucle y entre 60 y 65 °C para las regiones F1/B1 en los oligonucleótidos FIP/BIP. Debido a la orientación opuesta de las regiones F1 y F2 en el oligonucleótido FIP (y las regiones B1 y B2 en BIP), las bases

más destacadas en términos de especificidad están ubicadas en los extremos 5' y 3' de los extremos internos de los oligonucleótidos. El uso de hasta seis oligonucleótidos dirigidos a ocho regiones de la secuencia objetivo tiene el potencial de conferir un alto grado de especificidad (Tomlinson, 2016).

Se utiliza habitualmente la polimerasa Bst (derivada de *Bacillus stearothermophilus*), que tiene una temperatura de reacción óptima de 65 °C. Las reacciones LAMP se llevan a cabo típicamente a 65 °C (o en el rango de 63–66 °C) hasta por 60 min. Los reactivos desarrollados más recientemente que utilizan una enzima alternativa, Gsp M2.0 (una variante diseñada de ADN polimerasa GspM LF, aislada de *Geobacillus* sp. M; OptiGene), permiten una amplificación eficiente en tiempos de reacción significativamente reducidos de 30 min o menos (Tomlinson, 2016). Al usar enzimas que son tolerantes a sustancias potencialmente inhibitoras, LAMP permite el uso de métodos de extracción más rudimentarios, que son compatibles con métodos de prueba rápidos y simplificados (Tomlinson, 2016).

Las principales ventajas de LAMP sobre los enfoques convencionales basados en PCR son la velocidad de amplificación y el potencial para realizar las reacciones utilizando equipos muy simples como un baño de agua o un bloque calentado (Tomlinson, 2016). El método LAMP estándar requiere una pequeña cantidad de tiempo de preparación, que incluye de 10 a 30 min para el diseño del oligonucleótido (necesario para cada objetivo, pero solo una vez) y de 10 a 15 min para preparar el tampón LAMP y los reactivos (se pueden preparar a la vez reservas para >100 reacciones) (Tanner *et al.*, 2014). La eficiencia de amplificación lograda con LAMP distingue este método de muchas otras técnicas de amplificación, pero también constituye una desventaja potencial significativa del método, ya que el potencial de contaminación por arrastre con productos de amplificación es sustancialmente mayor que para otros métodos, por lo que los pasos previos y posteriores a la amplificación deben mantenerse separados en todo momento (Tomlinson, 2016).

Inicialmente, el oligonucleótido interno FIP, que contiene dos secuencias diana específicas de dos regiones diferentes en el ADN molde, se hibrida con el ADN diana y comienza la síntesis de la hebra complementaria (A). El oligonucleótido externo F3 inicia el desplazamiento de la hebra del oligonucleótido FIP amplificado, liberando ADN

monocatenario (ss) que sirve como molde para los oligonucleótidos inversos (B). El oligonucleótido BIP inicia la síntesis de la cadena en el ssADN y posteriormente es desplazado por el oligonucleótido B3 (C). Tanto el extremo 3' como el 5' son complementarios a las secuencias más internas, lo que permite la formación de una estructura de ADN de tallo-bucle (C y D). La estructura de tallo-bucle es el punto de partida para la amplificación exponencial. La autoiniciación y amplificación de su extremo 3' (F1) inducen el desplazamiento del extremo 5' (B1c), el posterior despliegue de la estructura de horquilla y el plegado hacia atrás de la hebra recién sintetizada. La repetición de la vía de autoiniciación genera amplicones largos con estructuras parecidas a bucles. Además, los oligonucleótidos internos y externos se hibridan con las estructuras de bucle e inician la síntesis de cadenas y el desplazamiento posterior. Los oligonucleótidos de bucle, que se hibridan con los bucles en la estructura de tallo-bucle (D), aceleran aún más LAMP (Becherer *et al.*, 2020).

El ensayo LAMP es simple, económico y 1,000 veces más sensible que la PCR con el gen *vlhA* para la detección rápida de MS, se realiza en un baño de agua durante una hora a 63 °C con 15 µL de mezcla de reacción que contiene 7.5 µL de mezcla maestra isotérmica (OptiGene, Horsham, West Sussex, Reino Unido), 10 pM de cada oligonucleótido interno FIP y BIP, 2.5 pM de cada oligonucleótido externo F3 y B3, 5 pM de oligonucleótidos "bucle" LF y LB, 1.5 µL de agua desionizada y 2 µL de plantilla de ADN y los resultados se visualizan después de la adición del tinte fluorescente SYBR Green (Kursa *et al.*, 2015). La solidez y precisión de LAMP con el gen *mgc2* lo hace potencialmente útil como herramienta de diagnóstico de campo para MG, usando una mezcla de reacción con mezcla maestra isotérmica, 40 pM de cada uno de los oligonucleótidos FIP y BIP, 5 pM de cada uno de los oligonucleótidos F3 y B3 y 1 µL de ADN molde (Ehtisham-ul-Haque *et al.*, 2017). LAMP basado en el gen *pdhA*, que codifica la subunidad principal (E1) en el complejo piruvato deshidrogenasa, logró una sensibilidad 10 veces mayor que un método de PCR existente, en un volumen final de 25 µL con 0.5 µL de ADN polimerasa Bst fragmento grande, 30 pM de cada uno de los oligonucleótidos internos FIP y BIP, 5 pM de cada uno de los oligonucleótidos externos F3 y B3 y 1 µL de plantilla diana (Zhang *et al.*, 2015). En el paso final, para inactivar la

enzima ADN polimerasa Bst, la mezcla de reacción se calienta a 80 °C durante 2 min (Kursa *et al.*, 2015), 5 min (Ehtisham-ul-Haque *et al.*, 2017) ó 10 min (Zhang *et al.*, 2015). A continuación, se presenta el cuadro 1 con la mezcla de oligonucleótidos LAMP donde se utilizó la fórmula general de dilución $C1V1=C2V2$, para calcular la dilución de los oligonucleótidos en la mezcla de trabajo, considerando la concentración final en la reacción que usaron Ehtisham-ul-Haque *et al.* (2017) para *mgc2* y Kursa *et al.* (2015) para *vlhA*, así como el cuadro 2 con la cantidad y componentes para el desarrollo de la reacción LAMP en un volumen final de 12.5 µL, adaptado de Kursa *et al.* (2015).

Cuadro 1. Preparación de las mezclas de oligonucleótidos LAMP.

Clave	C1, Original [pmol/µL]	V1, µL Alícuota, µL	C2, µL Rxn LAMP Mezcla LAMP	V2, µl (rxn LAMP) Mezcla final, µL
MG <i>mgc2</i> F3	284	0.88	5.0	50.0
MG <i>mgc2</i> FIP	87	22.99	40.0	50.0
MG <i>mgc2</i> BIP	84	23.81	40.0	50.0
MG <i>mgc2</i> B3	379	0.66	5.0	50.0
Mezcla oligos		48.3		50.0
Agua		1.7		
Stock 25 x		50.0		
MS <i>vlhA</i> F3	277	0.45	2.5	50.0
MS <i>vlhA</i> FIP	107	4.67	10.0	50.0
MS <i>vlhA</i> BIP	103	4.85	10.0	50.0
MS <i>vlhA</i> Loop	214	1.17	5.0	50.0
MS <i>vlhA</i> Loop	200	1.25	5.0	50.0
MS <i>vlhA</i> B3	342	0.37	2.5	50.0
Mezcla oligos		12.76		50.0
Agua		37.2		
Stock 20 x		50.0		

C1=Concentración inicial; V1=Volumen inicial; C2=Concentración final; V2=Volumen final; Rxn=reacción; pmol=picomolar; µL=microlitro

Cuadro 2. Cantidad y componentes para el desarrollo de la reacción LAMP

Componentes LAMP, μL	MG, propuesta	MS, propuesta	Kursa <i>et al.</i> (2015)
Mezcla de oligos	1	1	
FIP y BIP			1
F3 y B3			1
Loop F y B			1
Mezcla maestra BST	7.5	7.5	7.5
Agua	2	2	1.5
Muestra (ADN+, agua-)	2	2	2
Colorante			1
Volumen total	12.50	12.50	15.00

1.2.7 Regiones genómicas diana en las técnicas moleculares. Para diagnosticar la especie de *Mycoplasma* por técnicas moleculares, se ha utilizado una amplia gama de objetivos (Tan *et al.*, 2014), incluyendo los kits comerciales, cuyas secuencias de oligonucleótidos no está disponible públicamente para algunos de los kits (Hess *et al.*, 2007).

El ADN ribosomal 16S (ARNr 16S) es un marcador universal de aproximadamente 1500 nucleótidos codificado por el gen *rrs*, que se encuentra en todos los organismos conocidos y su función no ha cambiado, por lo que su estructura parece mantenerse por largos periodos de tiempo (Valenzuela-González *et al.*, 2015). El gen ARNr 16S tiene dos copias en los genomas de MG y MS y tiene una sensibilidad más alta porque tiene regiones altamente conservadas (Hess *et al.*, 2007). El ARNr 16S contiene también nueve regiones (V1–V9) menos conservadas o hipervariables (Baker *et al.*, 2003), que son útiles para estudios de filogenética y taxonomía (posibilita diferenciar especies). Todas las cepas de una especie son homogéneas para el gen ARNr 16S (García *et al.*, 1995). Con oligonucleótidos específicos de la especie a partir de secuencias de ARNr 16S es posible detectar MG y MS, ya que el oligonucleótido inverso interno específico de MG da una banda de 334 pb, mientras que el oligonucleótido directo interno específico para MS da un amplicón de 682 pb (Muhammad *et al.*, 2017).

La familia *vihA* (anteriormente denominada pMGA) que codifica lipoproteínas inmunodominantes y hemaglutininas que experimentan expresión de fase variable

contiene 43 genes distribuidos entre cinco *loci* que contienen 8, 2, 9, 12 y 12 genes y constituye el 10.4% (103 Kb) del genoma total de MG (Papazisi *et al.*, 2003), mientras que esta región *vlhA* en MS comprende 64 genes que ocupan más del 8% del genoma en la cepa MS 53 (Vasconcelos *et al.*, 2005). El gen *vlhA* específico de MS se conserva altamente en 180 secuencias disponibles en el GenBank (Kuo *et al.*, 2017). Solo un miembro de la familia de genes *vlhA* contiene un promotor en MS, mientras que el resto de los genes de la familia no tienen promotor y se denominan pseudogenes. Según el grado de variación de secuencia, el gen *vlhA* se puede dividir en tres regiones principales: conservada, semivariable y altamente variable. La lipoproteína principal de superficie B (MSPB) está codificada en el extremo 5', tiene un segmento conservado de una sola copia (~700 pb), pero incluye dos regiones polimórficas (repeticiones ricas en prolina [PRR] en la región amino terminal y región polimórfica de trinucleótidos repetidos GAA [RIII]), regiones conservadas de múltiples copias y una región semivariable. La proteína hemaglutinina de superficie principal A (MSPA) de la región carboxi terminal está codificada en el extremo 3' y tiene regiones altamente variables principalmente, regiones semivariables y regiones conservadas de múltiples copias dentro de los pseudogenes. Los pseudogenes existen en el genoma en diferentes tamaños y abarcan diferentes partes del gen. Solo un número limitado de pseudogenes grandes se cruzan en la región conservada y se superponen a la copia única del gen. La mayoría de los pseudogenes se alinean con partes de las regiones semivariables o altamente variables (El-Gazzar *et al.*, 2012). La región repetida rica en prolina (PRR) y los polimorfismos de nucleótidos de la región RIII en los fragmentos de los genes *vlhA* son útiles para la tipificación y subtipificación de las cepas de MS (Limpavithayakul *et al.*, 2016).

El gen *mgc2* de 912 nucleótidos pertenece a una familia conservada de genes entre micoplasmas patógenos y codifica la proteína citoadhesina 2 de MG (MGC2) de 32.6 kDa (Hnatow *et al.*, 1998). El gen *mgc2* codifica la proteína de superficie MGC2 relacionada con la citoadherencia y se utiliza para el genotipado por su variabilidad genética (Gharaibeh *et al.*, 2011). La banda del amplicón del gen *mgc2* tiene un tamaño aproximado que varía de 750 a 800 pb con una región variable de 256 pb, cuya principal variación en la secuencia está en la posición 105 a 173 (Rajkumar, Maddula & Somvanshi, 2019).

El gen *gapA* (previamente conocido como *mgc1*) es un gen central conservado de copia única de 2,895 pb en un operón de múltiples genes en el genoma que codifica una proteína con una masa molecular de 105 KDa que participa en la citoadherencia de MG a las células huésped (Goh *et al.*, 1998).

El gen que codifica la proteína adhesina putativa de fase variable (*pvpA*) tiene un tamaño variable entre las cepas de MG como resultado de deleciones que se producen en el segmento que codifica la región carboxi terminal rica en prolina expuesta a la superficie de la proteína PvpA, que es una proteína de membrana integral no lipídica que contiene dos secuencias idénticas directamente repetidas (DR-1 y DR-2) de 52 aminoácidos cada una (Liu *et al.*, 2001).

El gen lipoproteína (*Lp*) que codifica una lipoproteína conservada de superficie hipotética (MGA_0319) fue utilizado por Ferguson *et al.* (2005) junto con tres citoadhesinas (*gapA*, *mgc2* y *pvpA*) para caracterización molecular de MG en estudios epidemiológicos y por Khumpim *et al.* (2015) para demostrar su participación en la virulencia y patogenicidad de cepas de MG y está presente, al igual que el gen *gapA*, en el genoma central del 100% de 81 genomas de MG, mientras que *mgc2* en el 75% de los genomas y *pvpA* solo en el 24% de los genomas (Ghanem *et al.*, 2018).

La región espaciadora intergénica (REI) entre los genes ARNr 16S y 23S contiene 660 nucleótidos y es específico de MG (probado en 18 especies de *Mollicute* aviar) (Raviv *et al.*, 2007) y tiene mayor variación dentro de diferentes especies y cepas de micoplasmas aviares que el gen ARNr 16S (Tomar *et al.*, 2017). Ésta región REI tiene alta variación entre especies y baja dentro de las especies de micoplasma aviar (Ramírez *et al.*, 2008). En infecciones muy tempranas de MS, el gen ARNr 16S puede ser más sensible que *vlhA* (Hong *et al.*, 2004). La divergencia en la secuencia de nucleótidos entre cepas de MG es mayor en los genes *vlhA* y *pvpA* y menor en REI y *gapA*, por ello los genes con mayor variación en el tamaño del amplicón *vlhA* (226–352 pb) y *pvpA* (374–695 pb) tienen mayor poder discriminatorio que REI (811–815 pb), *gapA* (332 pb) y *mgc2* (791–857 pb), debido principalmente a las altas variaciones en la secuencia entre cepas de estos genes y a que los genes *vlhA* y *pvpA* producen múltiples amplicones entre cepas (Ghorashi *et al.*, 2013).

El gen ARNr 23S se ha utilizado para detectar resistencia a los agentes antimicrobianos por mutaciones asociadas en posiciones específicas (Beylefeld *et al.*, 2018). Las secuencias del gen ARNr 23S tienen una distribución alternada de segmentos altamente conservados y variables en todo el *locus* del gen, con un segmento variable (alrededor de la posición 2100) de 600 pb en el dominio central de considerable diversidad de secuencia con sitios discriminatorios (Schnee *et al.*, 2012). Por lo tanto, éste gen se podría utilizar como nueva estrategia de diagnóstico para múltiples géneros de bacterias por su poder discriminatorio a través de secuenciación, ya que el fragmento de 108 nucleótidos que traslapa con la REI está relativamente conservado intraespecies.

1.2.8 Amplificación del ADN. La PCR es una solución acuosa que contiene al menos desoxinucleótidos (dNTP), fuentes de iones polivalentes como MgCl₂, reactivos de tamponamiento, un par de oligonucleótidos de secuencia específica y una enzima activa como la polimerasa. La reacción se realiza con un perfil térmico definido (generalmente entre 25 y 50 ciclos de calentamiento y enfriamiento). Durante cada ciclo térmico individual, los dos oligonucleótidos (oligonucleótidos complementarios de la secuencia diana) hibridan con la secuencia diana monocatenaria, definiendo así el inicio de la duplicación realizada por la polimerasa en el siguiente paso térmico en ambas cadenas. El ciclo térmico puede dar como resultado teóricamente más de un billón de réplicas (amplicones) por 40 ciclos térmicos. Esta amplificación abundante permite la detección de la secuencia objetivo. El ciclo térmico se realiza en termocicladores programables, libres de mantenimiento y económicos. El amplicón normalmente se detecta visualmente a través de electroforesis en gel de agarosa o mediante otras técnicas colorimétricas, pero también se puede detectar de forma semiautomática, por ejemplo, en equipos de electroforesis capilar con la respectiva adquisición óptica de datos y aplicación de *software* específico para el análisis (Liman *et al.*, 2014). El tinte fluorescente se intercala entre las bases de ADN y ARN (Corley, 2004). Lee *et al.* (2012) indica que el tinte de carga de gel se prepara típicamente a una concentración de 6X (azul de bromofenol al 0.25%, cianol de xileno al 0.25%, glicerol al 30%). El tinte de carga ayuda a rastrear qué tan lejos ha viajado la muestra de ADN y también permite que la muestra se precipite en el gel. Los métodos de PCR clásicos son reemplazados cada vez más por métodos de

PCR en tiempo real que proporcionan un reducido riesgo de contaminación e intensidad de trabajo (Liman *et al.*, 2014).

A continuación, se describe detalladamente el proceso de amplificación de ADN integrando los datos de algunos estudios que se resumen en el cuadro 3. Para la identificación de MG o MS a través de PCR se utiliza un par de oligonucleótidos (directo e inverso) dirigidos a una región genómica específica de la especie (principalmente genes ARNr 16S, *mgc2*, *Lp* o *vlhA*). La reacción de PCR se realiza en un termociclador en un volumen total generalmente de 25 μ L (25-100 μ L) que contiene 6 μ L de plantilla de ADN, 1-1.5 μ L de los oligonucleótidos (10 pM), 4 μ L de MgCl₂ 25 mM ó 2 μ L de MgCl₂ 50 mM, 0.5-1 μ L de desoxinucleótido (dNTP) 10 mM, 1 U de Taq ADN polimerasa, 2.5 μ L de tampón 10x de PCR y agua destilada desionizada libre de nucleasas cuyo volumen es la diferencia del volumen total menos la suma de MgCl₂, oligonucleótidos, dNTP, Taq polimerasa y el tampón, habitualmente es ~16 (14-19) μ L cuando el volumen total es 25 μ L. Se utilizan cepas de referencia de MG o MS como controles positivos y agua destilada estéril como control negativo en todas las reacciones de PCR. La reacción de PCR comprende una desnaturalización inicial en su mayoría a 94 °C durante 3 (1.8-5) min seguido de 35 (35-40) ciclos con desnaturalización a 94 °C durante 30 s, amplificación a 55 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 60 s y una etapa de extensión final de 5 min a 72 °C. Alícuotas de 5-10 μ L de los productos amplificados se cargan en los pocillos individuales del gel y se separan mediante electroforesis (90-100 voltios durante 30 min) en el gel de agarosa al 1.5% en 1% tampón TBE (tris-borato-EDTA) o tampón TAE (1X de ácido tris-acético-EDTA) teñido con una tinción segura. En la primera fila de pozos, se carga el marcador/indicador genético de 100 pb. Los fragmentos de ADN (bandas resultantes) se visualizan mediante un transiluminador UltraVioleta. El tamaño molecular de los productos de PCR se compara con el marcador de ADN de 100 pb o los productos amplificados se someten a secuenciación de ADN para identificar las especies de micoplasmas mediante BLAST (<https://blast.Ncbi.Nlm.nih.gov/Blast>).

Cuadro 3. Resumen de condiciones de ciclado durante el proceso de la PCR convencional con diferentes regiones genómicas diana según la especie de micoplasma.

Región	Myc	In °C	In m	Cicl	Des °C	Des s	Amp °C	Amp s	Ext °C	Ext s	Fin °C	Fin m	Fuente del estudio
<i>mgc2</i>	MG	94	5		94	30	58	30	72	60			(Muhammad <i>et al.</i> , 2018)
<i>mgc2</i>	MG	95	3	35	94	30	58	40	72	60	72	10	(Younis <i>et al.</i> , 2018)
<i>mgc2</i>	MG	94	3	35	94	20	58	40	72	60	75	5	(Moscoso <i>et al.</i> , 2004)
<i>mgc2</i>	MG	94	5	35	94	30	55	30	72	60	72	10	(El-ordy <i>et al.</i> , 2020)
<i>mgc2</i>	MG												(Ganapathy <i>et al.</i> , 2021)
<i>mgc2</i>	MG	95	1	40	95	20	60	40	72	10	72	5	(Rasoulinezhad <i>et al.</i> , 2017)
<i>mgc2</i>	MG												(Moretti <i>et al.</i> , 2013)
Lp	MG	94	5	35			50	60	72	120	72	10	Hassan <i>et al.</i> , 2014)
Lp	MG	94	1	40	94	60	55	60	72	120	72	5	(Barros <i>et al.</i> , 2014)
16S	MG			40	94	30	55	30	72	60	72	5	(Khatoon <i>et al.</i> , 2018)
16S	MG	95	5	35	95	45	53	30	72	30	72	5	(Gharibi <i>et al.</i> , 2018)
16S	MG	95	3	34	94	30	54	30	72	90	72	5	(Abbas <i>et al.</i> , 2018)
16S	MG	94	0.5	35	94	30	55	30	72	60	72	7	(Manimaran <i>et al.</i> , 2019)
16S	MG	94	3	40	94	30	55	30	72	60	72	5	(Younis <i>et al.</i> , 2018)
16S	MS	94	1	40	94	60	55	60	72	120	72	5	(Barros <i>et al.</i> , 2014)
16S	MS			40	94	30	55	30	72	60	72	5	(Khatoon <i>et al.</i> , 2018)
16S	MS	94	5		94	30	55	30	72	60			(Muhammad <i>et al.</i> , 2018)
16S	MS	95	5	35	95	30	49	30	72	60	72	5	(Rasool <i>et al.</i> , 2018)
16S	MS	94	3	40	94	30	55	30	72	60	72	5	(Rasoulinezhad <i>et al.</i> , 2018)
IGSR	MS	94	2	35	94	30	55	30	72	60	72	7	(Kursa <i>et al.</i> , 2019)
<i>vlhA</i>	MS	94	2	35	94	30	55	30	72	60	72	7	(Kursa <i>et al.</i> , 2019)
<i>vlhA</i>	MS	95	5	35	95	45	53	30	72	30	72	5	(Gharibi <i>et al.</i> , 2018)
<i>vlhA</i>	MS	95	1	40	95	20	60	40	72	10	72	5	(Rasoulinezhad <i>et al.</i> , 2018)

Myc= Mycoplasma; In °C= Temperatura inicial; In m= Tiempo inicial en min; Cicl= Ciclos; Des °C=Temperatura de desnaturalización; Des s= Tiempo desnaturalización en segundos; Amp °C=Temperatura de amplificación; Amp s= Tiempo amplificación en segundos; Ext °C= Temperatura de extensión; Ext s= Tiempo de extensión en segundos; Fin °C= Temperatura de finalización; Fin m= Tiempo de finalización en min; Lp= Lipoproteína; IGSR= Región espaciadora intergénica (por sus siglas en inglés).

1.2.9 Separación de ácidos nucleicos mediante electroforesis en gel de agarosa.

Las moléculas de ácido nucleico se separan por tamaño con la ayuda de un campo eléctrico donde las moléculas cargadas negativamente migran hacia el polo positivo del ánodo (Yılmaz *et al.*, 2012). La columna vertebral de fosfato de la molécula de ADN (y ARN) está cargada negativamente, por lo tanto, cuando se coloca en un campo eléctrico, los fragmentos de ADN migrarán al ánodo con carga positiva (Lee *et al.*, 2012).

Los ácidos nucleicos no se alteran químicamente durante el proceso de separación por tamaños y las muestras se pueden recuperar y extraer de los geles fácilmente para estudios posteriores (Yılmaz *et al.*, 2012).

La velocidad de migración de una molécula de ADN a través de un gel está determinada por lo siguiente: 1) tamaño de la molécula de ADN; 2) concentración de agarosa; 3) conformación del ADN; 4) voltaje aplicado, 5) presencia de tinte intercalador, 6) tipo de agarosa y 7) tampón de electroforesis. Después de la separación, las moléculas de ADN se pueden visualizar bajo luz ultravioleta (Lee *et al.*, 2012).

Los geles de agarosa tradicionales son más efectivos en la separación de fragmentos de ADN entre 100 bp y 25 Kb. Los fragmentos de ADN de menos de 100 pb se separan de forma más eficaz mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (Lee *et al.*, 2012).

La concentración de agarosa en un gel dependerá de los tamaños de los fragmentos de ADN que se van a separar, con la mayoría de los geles comprendidos entre 0.5% y 2%. El volumen del tampón no debe ser superior a 1/3 de la capacidad del matraz (Lee *et al.*, 2012). El aumento de la concentración de agarosa de un gel disminuye la velocidad de migración y, por lo tanto, facilita la separación de las moléculas de ADN más pequeñas (Yılmaz *et al.*, 2012). El tamizado molecular está determinado por el tamaño de los poros generados por los haces de agarosa en la matriz del gel. En general, cuanto mayor es la concentración de agarosa, menor es el tamaño de los poros (Lee *et al.*, 2012).

Es importante tener en cuenta que diferentes formas de ADN se mueven a través del gel a diferentes velocidades. El ADN plasmídico superenrollado, debido a su conformación compacta, se mueve a través del gel más rápido, seguido de un fragmento de ADN lineal del mismo tamaño, con la forma circular abierta que viaja más lentamente (Lee *et al.*, 2012).

Se requieren diferentes voltajes óptimos para diferentes tamaños de fragmentos. La mejor resolución para fragmentos mayores de 2 Kb se obtiene aplicando no más de 5 voltios por cm al gel (Lodge *et al.*, 2007). Sin embargo, la elevación del voltaje (por encima de aproximadamente 5 a 8 V/cm) acelera el movimiento de las moléculas de ADN, pero se asocia con menor resolución de las bandas y eleva la posibilidad de fundir el gel (Yılmaz *et al.*, 2012).

La exposición del ADN a la fluorescencia UV debe realizarse rápidamente porque los ácidos nucleicos se degradan con exposiciones prolongadas (Yılmaz *et al.*, 2012). Si las bandas separadas serán purificadas para análisis posteriores, es aconsejable evitar la exposición del gel con luz ultravioleta. Como alternativa, podría usarse una fuente de excitación de luz azul con un tinte azul excitable (Yılmaz *et al.*, 2012). La agarosa de bajo punto de fusión se usa generalmente cuando se desea el aislamiento de fragmentos de ADN separados (Lee *et al.*, 2012).

Los tampones de carga (habitualmente tintes cianol de xileno y azul de bromofenol) cargados negativamente se agregan al ADN antes de cargarse en el gel porque son visibles a la luz natural y co-sedimentan con el ADN. Funcionan aproximadamente a la misma velocidad que los fragmentos de ADN que tienen 5000 pb y 300 pb, respectivamente (Yılmaz *et al.*, 2012).

Los tampones de amortiguamiento en gel más comunes son Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM (TAE) y Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM (TBE) (Lee *et al.*, 2012). Los dos tampones más comunes para los ácidos nucleicos son Tris/Acetato/EDTA (TAE) y Tris/Borato/EDTA (TBE). Los fragmentos de ADN migran con diferentes velocidades en estos dos tampones debido a las diferencias en la fuerza iónica. Los tampones establecen un pH ideal y proporcionan iones para mantener la conductividad. La desventaja del borato es que polimeriza y/o interactúa con cis dioles que se encuentran en el ARN, mientras que TAE tiene la menor capacidad de amortiguamiento, pero proporciona la mejor resolución para ADN más grande, lo que implica la necesidad de un voltaje más bajo y más tiempo con un mejor producto (Yılmaz *et al.*, 2012).

Los sistemas tampón de gel TAE son más convenientes que los sistemas TBE, si los métodos posteriores a la separación son el objetivo final del procesamiento de un gel (Rapley, 2000). Para la preparación del gel, se mezcla agarosa en polvo de grado de electroforesis con tampón de electroforesis a las concentraciones deseadas, entre 0.7% para tener buena separación o resolución de fragmentos de ADN grandes (5 a 10 Kb) y 2% para buena resolución de fragmentos pequeños de 0.2 a 1 Kb y luego se calienta en un horno microondas hasta que se disuelva completamente. La mezcla se enfría a 60 °C y se vierte en el molde para solidificación. Inmediatamente después de la solidificación del gel, se retira el peine y se coloca en los pocillos el producto de PCR mezclado con el

colorante de carga. Como los ácidos nucleicos tienen carga negativa, los pocillos deben colocarse hacia el electrodo negativo (Corley, 2004). El gel también puede teñirse después de la electroforesis con tintes alternativos al bromuro de etidio (EtBr) para la tinción de ADN (Lee *et al.*, 2012), como GelRed™ (Biotium) y GelGreen™ (Biotium) ya que no son tóxicos ni mutagénicos porque no penetran fácilmente en las células vivas o los guantes a concentraciones de trabajo (Haines *et al.*, 2015).

Yilmaz *et al.* (2012) describe el protocolo para electroforesis en gel de agarosa (modificado de Sambrook & Russel, 2006) con ácidos nucleicos y oligonucleótidos (muestras de ADN, estándares de tamaño de ADN y producto de PCR) y los tampones y soluciones (soluciones de agarosa, tampón de electroforesis TAE y TBE, solución de tinción de ADN y tampón de carga de gel 6x): se prepara una solución de agarosa en tampón de electroforesis, se calienta hasta que la agarosa se disuelva, se enfría el matraz con el gel derretido en baño de agua a 55 °C, se forman las ranuras de muestra con un peine en el gel, se vierte la solución de agarosa tibia en el molde, se deja 20-45 min que el gel se polimerice, se vierte tampón de electroforesis TAE o TBE para cubrir el gel aproximadamente 1 mm y se retira el peine, se coloca el gel en el dispositivo de electroforesis, se mezcla la muestra con tinte en una proporción de 1:5 o 1:10. El tinte de carga de gel se prepara a una concentración de 6X (azul de bromofenol al 0.25%, cianol de xileno al 0.25%, glicerol al 30%) (Lee *et al.*, 2012). Se carga la mezcla de muestra en las ranuras del gel y los estándares de tamaño, se cierra la tapa, se conectan los cables negros más cerca de los pozos para que el ADN migre hacia el ánodo positivo (cable rojo). Se aplica un voltaje de 1-5 V/cm hasta que en pocos minutos el azul de bromofenol y el xileno cianol FF hayan migrado de los pocillos hasta el último tercio del gel, se apaga la corriente eléctrica, se retiran los cables y la tapa del tanque de gel.

Los ácidos nucleicos que se corren en una electroforesis pueden detectarse mediante tinción con un tinte y visualizarse bajo luz UV de 300 nm. La mayor parte de la fluorescencia asociada con la tinción de ADN o ARN monocatenario se atribuye a la unión del tinte a dúplex intracatenarios cortos en las moléculas (Sambrook & Russel 2006).

Cuando se exponen a la luz ultravioleta, se activan los electrones del anillo aromático de la molécula de reactivo que se utiliza para teñir el ADN en geles de agarosa, lo que

conduce a la liberación de energía (luz) a medida que los electrones regresan al estado fundamental. EtBr actúa intercalando en la molécula de ADN de una manera dependiente de la concentración. Esto permite una estimación de la cantidad de ADN en cualquier banda de ADN en particular en función de su intensidad. Debido a su carga positiva, el uso de EtBr reduce la tasa de migración del ADN en un 15%.

Históricamente, EtBr fue el tinte más utilizado para la tinción en gel. Sin embargo, a pesar de su mutagenicidad y toxicidad, todavía se usan el EtBr y SYBR® Green I en los laboratorios. Actualmente se prefieren otros tintes que son más seguros para el usuario y el medio ambiente tales como GelRed™ (Biotium) y GelGreen™ (Biotium) que son no tóxicos y no mutagénicos porque no penetran fácilmente en las células vivas o los guantes a concentraciones de trabajo (Haines *et al.*, 2015). Los tintes alternativos no funcionan bien cuando se agregan directamente al gel, por lo tanto, el gel deberá teñirse después de la electroforesis (Lee *et al.*, 2012). GelRed™ fue el tinte más sensible y seguro para usar con excitación de luz ultravioleta (Guzaev *et al.*, 2017). GelRed (0.2/μL de 10,000x *stock*) diluido a la concentración 100x en 6x de amortiguador de carga puede usarse en gel de agarosa al 2.5% para determinar de manera confiable (consistente y con éxito) el tamaño del fragmento de ADN sin cambiar la movilidad de la banda. Una sola muestra requiere de 1 μL de GelRed 100x (\$0.002/muestra) y se puede agregar al amortiguador de carga (que a su vez se añade a la muestra de ADN 10 min antes de la carga del gel) para reducir el costo manteniendo su sensibilidad al mismo nivel (Huang *et al.*, 2010).

En el resultado típico después de la electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR, los fragmentos de ADN resultantes son visibles como bandas claramente definidas. El patrón de ADN o la escalera deben estar separados en un grado que permita la determinación útil de los tamaños de las bandas de muestra (Lee *et al.*, 2012). Los tamaños exactos de los fragmentos de ADN separados se pueden determinar trazando el logaritmo del tamaño molecular para las diferentes bandas de un estándar de ADN frente a la distancia recorrida por cada banda. El estándar de ADN contiene una mezcla de fragmentos de ADN de tamaños predeterminados que se pueden comparar con las muestras de ADN desconocidas (Lee *et al.*, 2012). El patrón de bandas del ADN se resuelve a través del gel mediante imágenes grabadas (Yılmaz *et al.*, 2012).

1.3 CONCLUSIONES

La producción avícola es una fuente fundamental de proteína animal y una importante actividad económica para algunos países y regiones del mundo, ya que la carne de aves domésticas representa el 38.5% de la producción mundial de carne, donde nueve países (EUA, China, Indonesia, Brasil, Pakistán, Irán, India, México y Rusia) concentran el 63% de la población avícola mundial. Sin embargo, las enfermedades respiratorias representan un desafío importante para la industria avícola, ya que las infecciones subclínicas y clínicas causan pérdidas sustanciales de producción debido a mortalidad significativa, escasa ganancia de peso corporal, deficiente eficiencia de conversión alimenticia y aumento de los decomisos de canales en aves de tipo cárnico, así como caídas en la producción y calidad de huevos en aves ponedoras y reproductoras. Los micoplasmas son los procariontes autorreplicantes más pequeños sin pared celular patógenos con una amplia distribución ambiental y de hospedadores que se transmiten de manera vertical y horizontal y pueden persistir mucho tiempo al evadir la inmunidad del huésped. En las aves domésticas, las principales especies patógenas de micoplasma son MG y MS, que están incluidas en la lista de la OMSA, aunque en México no existe legislación respecto a MG y MS en las 27 Normas Oficiales Mexicanas. En general, predominan las infecciones por MS en granjas avícolas comerciales en comparación con MG en diferentes regiones del mundo. MG es la especie patógena más significativa económicamente y la enfermedad es variable en gravedad y duración, pero tiende a ser más severa y de mayor duración en los meses fríos y afecta más severamente a las aves más jóvenes que a las adultas. A excepción de las infecciones adquiridas por transmisión del huevo, las vías respiratorias superiores y/o la conjuntiva son las puertas de entrada para las infecciones por MG, que tras la invasión de células no fagocíticas a través de proteínas de virulencia unidas a la membrana ocurre la diseminación sistémica de MG desde el tracto respiratorio hasta los órganos internos, persistiendo de manera crónica al evadir la inmunidad con cambios proteómicos, genómicos y metabólicos adaptándose al ambiente intracelular y que con la producción de enzimas CysP puede escindir la IgG del huésped y con los subproductos peróxido de hidrógeno y radicales superóxido, junto con las citocinas inflamatorias del huésped exacerba la enfermedad. Para el control, la vacunación con cepas vivas contra MG o MS puede ser una solución

útil a largo plazo en situaciones en las que no es posible mantener las parvadas libres de infección, especialmente en sitios de producción de huevos comerciales de edades múltiples. Como herramientas diagnósticas, las técnicas moleculares permiten la detección rápida, confiable, precisa, sensible y específica de infecciones por micoplasma en aves. En particular, la técnica LAMP es económica y accesible para su uso en lugares que carecen de instrumentación compleja y/o costosa, porque permite el uso de métodos de extracción más rudimentarios donde sólo es necesario un baño de agua que proporcione una temperatura constante de 60-70 °C y permite distinguir a simple vista la turbidez causada por el precipitado blanco de pirofosfato de magnesio cuando el ácido nucleico amplifica. La micoplasmosis aviar causada por MG y MS sigue siendo de los mayores problemas respiratorios en la industria avícola mundial y nacional, de tal manera que el monitoreo de las parvadas de aves para la detección temprana de la infección permitirá estimar la magnitud e identificar los sitios de alta ocurrencia para implementar estrategias de vigilancia e intervención para contener la infección por MG y MS que conduzcan a reducir gradualmente la ocurrencia de micoplasmas y su impacto económico negativo concomitante.

1.4

CAPÍTULO 2. Ocurrencia global de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* en aves domésticas: una revisión sistemática y un metanálisis

2.1 RESUMEN Y ABSTRACT

A nivel mundial, *Mycoplasma gallisepticum* (MG) y *M. synoviae* (MS) son los principales agentes responsables de la enfermedad respiratoria crónica en las aves domésticas. Realizamos una revisión sistemática y un metanálisis para estimar su ocurrencia combinada. Se realizaron búsquedas en bases de datos electrónicas para encontrar publicaciones revisadas por pares que informaran sobre la detección molecular de MG y MS en aves domésticas y se utilizó un metanálisis para estimar su ocurrencia agrupada (combinada en parvada e individual), agregando resultados a nivel regional y nacional. Realizamos un metanálisis de subgrupos para las subpoblaciones: pollos de engorda, gallinas ponedoras, reproductores y avicultura doméstica diversa incluyendo pavos, patos, avestruces y utilizamos la metarregresión con modificadores categóricos. Recuperamos 2,294 publicaciones de seis bases de datos electrónicas e incluimos 85 publicaciones de 33 países que informaron 62 estudios independientes con 22,162 muestras para MG y 48 estudios con 26,413 muestras para MS. La ocurrencia global agrupada fue del 38.4% (IC del 95%: 23.5-54.5) para MS y del 27.0% (20.4-34.2) para MG. Entre las regiones, Europa y Asia central tuvieron la ocurrencia más baja de ambos patógenos, mientras que MG y MS tuvieron una alta ocurrencia en Asia meridional y África subsahariana, respectivamente. A nivel nacional, la ocurrencia de MG fue mayor en Argelia, Arabia Saudita y Sudán, mientras que China, Egipto y Etiopía informaron valores más altos de MS. Entre las subpoblaciones de aves domésticas, MS y MG fueron más frecuentes en reproductores y ponedoras (62.6% y 31.2%, respectivamente) que en la avicultura diversa. El año de publicación, el tamaño muestral y el nivel de contaminación del aire ambiental (medido indirectamente por PM_{2.5}) se asociaron con la ocurrencia de ambos micoplasmas. Nuestro estudio reveló valores de ocurrencia altos y heterogéneos de MG y MS y justifica la necesidad de una detección temprana y mejores medidas de control para reducir la propagación de éstos patógenos.

Palabras clave: Micoplasmosis aviar, enfermedad respiratoria aviar, infección bacteriana, detección molecular, estudio sistemático

2.2 INTRODUCCIÓN

La micoplasmosis aviar es causada por varios micoplasmas patógenos entre los cuales *Mycoplasma gallisepticum* (MG) y *M. synoviae* (MS) son los más importantes. Ambos patógenos están listados y son notificables a la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2019). MG causa una enfermedad crónica respiratoria en las aves domésticas y es una de las principales causas de pérdidas económicas para esta industria (Hennigan *et al.*, 2012). Económicamente, MG es la especie más importante de Mycoplasma porque podría causar pérdidas anuales estimadas de 140 millones de dólares solo en EUA únicamente por producción de huevo (Peebles *et al.*, 2006), mientras que en pollo de engorda, una sola compañía en Carolina del Norte, EUA, estimó pérdidas debido a MG de hasta \$750,000 en seis meses (Evans *et al.*, 2005). MS se ha considerado tradicionalmente como la segunda especie de micoplasma aviar más importante de pollos comerciales desde el punto de vista clínico y económico (Feberwee *et al.*, 2009). La infección por MS generalmente se asocia con un crecimiento deficiente y una degradación significativa de las canales (Landman, 2014), una disminución en la producción de huevos (Stipkovits & Kempf, 1996) y la inducción de anomalías en el ápice del cascarón (Kursa *et al.*, 2019). La infección por MS ocurre con frecuencia como una enfermedad subclínica de las vías respiratorias superiores, aunque puede causar aerosaculitis o sinovitis severa cuando ocurren coinfecciones con otros patógenos virales o bacterianos (Kleven *et al.*, 1972). Por lo tanto, una de las principales inflamaciones causadas por la MS es la sinovitis que se produce en la vaina del tendón sinovial y la articulación sinovial (Morrow *et al.*, 1990). Los pollos con sinovitis infecciosa pueden exhibir crestas pálidas, cojera y retraso en el crecimiento e inflamación alrededor de las articulaciones (OIE, 2019), que generalmente contienen un exudado cremoso viscoso en la articulación y las vainas de los tendones, junto con hepatoesplenomegalia y riñones inflamados moteados (Kleven & Ferguson-Noel, 2008). Algunos de los cambios patológicos incluyen una extensa infiltración de células inflamatorias dispersas y focales de la capa sinovial de la vaina del tendón (Xu *et al.*, 2020).

La contención eficiente de estos dos patógenos requiere identificar las aves infectadas para reducir el riesgo de transmitir la infección a aves sanas, así como priorizar medidas de cuidado y control en regiones geográficas con alta prevalencia de MG y MS.

Actualmente existen varios reportes de seroprevalencia de micoplasmas en granjas avícolas en el mundo (Ali *et al.*, 2015; Atta ur *et al.*, 2018; Feberwee *et al.*, 2008; Xue *et al.*, 2017). Sin embargo, estos son basados en una prueba serológica que puede carecer de especificidad o sensibilidad (OIE, 2019) o también puede ser inexacta para la detección de micoplasmosis aviar porque las pruebas serológicas no pueden usarse para determinar si la presencia de anticuerpos se debe a la infección con una cepa de campo o al resultado de la inmunoprofilaxis (Kursa *et al.*, 2016). Además, es posible que el cribado serológico no detecte las infecciones subclínicas por MS y que los programas de seguimiento que dependen únicamente de la detección de la seroconversión sean inadecuados (Kleven *et al.*, 2001).

Una alternativa a las técnicas de diagnóstico convencionales es el uso de métodos moleculares que permiten la detección confiable y precisa de cepas específicas de micoplasma en aves domésticas (OIE, 2019). No obstante, los métodos moleculares no deben sustituir sino complementar las pruebas serológicas tradicionales y la identificación de patógenos micoplásmicos mediante técnicas de cultivo estándar. El uso de métodos de biología molecular permite no solo diagnósticos de laboratorio rápidos y precisos en aves mediante la detección de infecciones por micoplasmas, sino que también permite una mejor caracterización de los aislados obtenidos, así como la confirmación o exclusión de los resultados de las pruebas serológicas (Kursa *et al.*, 2016). Sin embargo, ningún estudio se ha centrado en estimar la ocurrencia molecular global de MG y MS reportada en la literatura científica publicada. Dicha información podría ser útil a nivel regional y nacional para 1) estimar la magnitud de la ocurrencia molecular de micoplasmosis en aves domésticas, 2) mapear las regiones y países en los que MG y MS son altamente prevalentes y 3) diseñar estrategias de contención a la medida para identificar parvadas con mayor riesgo de contaminación o establecer programas con parvadas de reproductores libres de patógenos (Moronato *et al.*, 2018), así como proporcionar medidas profilácticas como vacunación y medicación (Zhao *et al.*, 2018).

En el actual estudio, se realizó una revisión sistemática y un metanálisis para estimar la ocurrencia global de la infección por MG y MS en las aves domésticas. Nuestro objetivo fue resumir la literatura disponible que informa la presencia molecular de estos dos

patógenos en las aves domésticas para evaluar la magnitud de la infección y servir como punto de comparación con las estimaciones de seroprevalencia disponibles de la micoplasmosis aviar. Los resultados de este estudio podrían proporcionar una guía valiosa para seleccionar regiones y países de alta incidencia en los cuales implementar y mejorar las estrategias regulares de vigilancia e intervención destinadas a disminuir la carga y el impacto económico de la micoplasmosis aviar.

2.3 MÉTODOS

2.3.1 Protocolo y objetivos. Este estudio se realizó siguiendo un protocolo que se desarrolló *a priori* por MACI y DD de acuerdo con los elementos de informes preferidos para las revisiones sistemáticas y la declaración del Protocolo de metanálisis (PRISMA-P) (Moher *et al.*, 2015). El protocolo está disponible en el sitio web de *Open Science Framework* (https://osf.io/kya5c/?view_only=369878d4a11248b3857529b94f8ca248). Realizamos una revisión sistemática y metanálisis para abordar la pregunta: ¿Cuál es la ocurrencia combinada, regional y nacional de la infección por MG y MS en aves domésticas? Nuestro estudio se realizó de acuerdo con las pautas Cochrane (Higgins *et al.*, 2019) y se informa siguiendo la declaración de PRISMA (Liberati *et al.*, 2009).

2.3.2 Criterios de elegibilidad. Los criterios de inclusión para las publicaciones fueron los siguientes: 1) la publicación incluyó una población de aves domésticas diferenciadas según la función zootécnica en gallinas ponedoras, pollos de engorda, reproductoras (tanto para pollo de engorda como para ponedoras) o una categoría denominada “avicultura diversa” que incluía otras especies de aves como pavos, patos o avestruces, pero excluía aves silvestres, canoras o de ornato, 2) las muestras de las poblaciones avícolas (niveles individuales o de parvada) se analizaron para detectar la presencia de infección por MG o MS por métodos moleculares, 3) la publicación informó la ocurrencia de aves/muestras positivas para MG o MS o presentó datos sin procesar a partir de los cuales se estimó la ocurrencia (número de positivos/total evaluado) y 4) los estudios fueron publicaciones primarias revisadas por pares en inglés, portugués o español disponibles en texto completo y los tipos de estudios fueron transversales, estudio de caso o estudios retrospectivos sin imponer limitaciones temporales o regionales. Para asegurar una comparabilidad metodológica óptima entre las publicaciones, incluimos revistas consideradas en su mayoría en *Scimago Journal y Country Rank* (SJR) y no se

incluyó literatura gris (es decir, estudios no publicados, informes, actas de congresos o tesis) en el trabajo (van Driel *et al.*, 2009).

2.3.3 Fuentes de información y metodología de búsqueda. Se realizaron búsquedas en *PubMed*, *Web of Science*, *CAB Abstract*, *Science Direct*, Biblioteca Virtual de Salud (BVS) y SciELO para encontrar estudios relevantes. Este proceso de tres etapas se completó del 1 de septiembre al 2 de octubre de 2019: primero, el equipo de revisión definió un diccionario de sinónimos compuesto por una amplia variedad de términos; segundo, MACI y DD probaron estos términos en búsquedas piloto para seleccionar los términos de búsqueda más relevantes que permitieran búsquedas más específicas y sensibles; tercero, MACI realizó las búsquedas finales en bases de datos electrónicas. Los términos finales de búsqueda se definieron de acuerdo con la población (ave doméstica O pollito O reproductor O pollo de engorda O ave), el factor de estudio (enfermedad respiratoria crónica O micoplasma aviar O patógeno respiratorio aviar O *Mycoplasma gallisepticum* O *Mycoplasma sinoviae* O micoplasmosis) y el resultado (ocurrencia O epidemiología O epidemiología molecular O ocurrencia molecular O vigilancia molecular O ocurrencia de PCR O confirmación molecular). Se utilizaron operadores booleanos (Y, O y NO) para el comando de búsqueda, que se definió de la siguiente manera: (población) Y (factor de estudio) Y (resultado) y se utilizaron filtros metodológicos dentro de cada base de datos para refinar el proceso de búsqueda. Las búsquedas completas representativas por base de datos se presentan en el Apéndice web 1 del material complementario.

2.3.4 Proceso de selección. Una vez completadas las búsquedas, los registros se recopilaron en un solo archivo EndNote X9 (Thomson Reuters, EUA) y luego los duplicados fueron eliminados de forma automática y manual por MACI. Una vez que se eliminaron los duplicados, este revisor realizó el proceso de selección, primero basándose en el título y luego en el resumen. A continuación, MAIC y DZV utilizaron de forma independiente un cuestionario estandarizado basado en los criterios de elegibilidad para seleccionar las publicaciones para su inclusión final (Apéndice web 2). Antes de la elegibilidad del ensayo, el cuestionario se probó en el 10% de las publicaciones seleccionadas al azar de la base de datos. Antes de que DD corrigiera las

discrepancias entre MAIC y DZV, encontramos una tasa de consenso moderada según el valor *Kappa* de Cohen de 0.618 ($T = 7.34$, $P < 0.000$).

Cuadro 4. Definición de criterios de elegibilidad para los estudios.

Criterio de inclusión	Definición	Comando de búsqueda
Poblacion	Aves de cualquier edad, sexo y estirpe con distinción por función zootécnica (gallina ponedora, pollos de engorda, reproductores o avicultura diversa: no relacionadas con las tres categorías anteriores, pero sin incluir aves silvestres, canoras u ornamentales). El factor de estudio para la población fue la presencia de aves positivas para MG o MS mediante pruebas moleculares en diferentes tipos de muestras.	<i>(poultry OR chick OR breeder OR broiler OR bird OR turkey)</i> <i>AND</i> <i>(chronic respiratory disease OR avian mycoplasma OR avian respiratory pathogen OR mycoplasma gallisepticum OR mycoplasma synoviae OR mycoplasmosis)</i>
Desenlace	Prevalencia, definida como el número de aves que dieron positivo para MG o MS mediante un enfoque molecular en muestras a nivel individual o colectivo (muestras agrupadas, granja o parvada) dividido por el número total de muestras estudiadas	<i>AND (prevalence OR epidemiology OR molecular epidemiology OR molecular prevalence OR molecular surveillance OR PCR-prevalence OR molecular confirmation OR 16S gene)</i>

Estudio	Estudios primarios publicados en inglés, español o portugués como artículos de texto completo revisados por pares. Los tipos de estudios fueron transversales, de casos o retrospectivos sin imponer limitaciones temporales o regionales.
---------	--

2.3.5 Extracción de datos. MACI extrajo datos de las publicaciones seleccionadas utilizando un formato predefinido basado *a priori* en los criterios de elegibilidad (Apéndice web 3). El cuestionario estandarizado se puso a prueba en el 10% de las publicaciones seleccionadas al azar de la base de datos. Se extrajeron las principales características de las publicaciones para construir cuadros resumen en Excel que incluyeron estudio (autor y año de publicación), región geográfica donde se realizó el estudio, características de la población y función zootécnica (reproductores, gallinas ponedoras, pollos de engorda y avicultura doméstica diversa "patos, pavos o avestruces"), tipo de muestra evaluada (tejido o hisopo), técnica de diagnóstico, región genómica objetivo y resultado (número de aves positivas para la infección por MG o MS dividido por el tamaño total de las muestras evaluadas). La ocurrencia de la infección por MG o MS se consideró la única medida de resultado. En los casos en que las publicaciones incluían datos tanto a nivel individual como a nivel colectivo (muestras agrupadas o parvada), elegimos datos a nivel individual porque encontramos una estimación más consistente y precisa en comparación con los datos a nivel colectivo. Las publicaciones que evaluaron independientemente tanto MG como MS se extrajeron por separado y se contaron como un estudio por especie. Además, algunas publicaciones informaron una ocurrencia general de MG o MS e incluyeron valores de ocurrencia estratificados por subpoblación; es decir, reproductores, gallinas ponedoras, pollos y avicultura diversa. Además, incluimos un "subgrupo mixto" para indicar aquellos estudios que incluyen al menos dos categorías de aves domésticas (reproductores, gallinas ponedoras, pollos o avicultura diversa) y no informaron valores de ocurrencia diferenciados por subpoblación. Por lo tanto, para algunos estudios extrajimos hasta ocho valores de ocurrencia distribuidos en los dos patógenos y las cuatro subpoblaciones. No hubo confirmación de los datos con

los autores. Sin embargo, DZV confirmó la información extraída de todos los estudios y corrigió cualquier discrepancia.

2.3.6 Evaluación del riesgo de sesgo en estudios individuales. Utilizamos una modificación de la herramienta de evaluación Cochrane (Higgins *et al.*, 2019) para evaluar el riesgo de sesgo en los estudios individuales. Los estudios se calificaron como de riesgo de sesgo bajo, alto o poco claro según los siguientes criterios: 1) definición adecuada de la población incluida en el estudio, 2) técnica alternativa para el diagnóstico de micoplasmosis aviar, 3) uso de un método molecular que especifica la región genómica objetivo de MG o MS en aves domésticas, 4) evaluación de todas las muestras positivas y negativas incluidas en el estudio, 5) coherencia del informe (sin discrepancias en los resultados) y 6) informe selectivo (omisión de datos faltantes por muestras sin seguimiento).

2.3.7 Resumen de medidas y análisis estadístico. La ocurrencia de MG y MS en aves domésticas se resumió cuantitativamente mediante un metanálisis de proporciones para obtener una estimación combinada de estudios individuales utilizando la transformación de doble arcoseno de Freeman-Tukey para estabilizar la varianza (Barendregt *et al.*, 2013) con un intervalo de confianza exacto de 95% (Nyaga *et al.*, 2014). Debido a la heterogeneidad esperada entre los estudios, definimos *a priori* un modelo de efectos aleatorios (D-L) (Nikolakopoulou *et al.*, 2014). Utilizamos metanálisis de subgrupos para agregar estudios independientes primero a nivel nacional y luego a nivel regional según las siete regiones definidas por la Organización Mundial de la Salud [OMS] (WHO, 2003): África subsahariana, Medio Oriente y África del Norte, América del Norte, América Latina y el Caribe, Europa y Asia Central, Asia Meridional y Asia Oriental y el Pacífico. Como se describe en otra parte (Díaz *et al.*, 2019; Romo-Barron *et al.*, 2019), usamos una prueba de significancia para el efecto general con la estadística z (tamaño del efecto = 0) y evaluamos la heterogeneidad significativa entre los ensayos con la estadística Q de Cochran (prueba χ^2). Finalmente, utilizamos la estadística I^2 para determinar la proporción de variación en los efectos debido a variaciones por los efectos verdaderos en lugar de error de muestreo (Borenstein *et al.*, 2017). No realizamos una evaluación del sesgo de publicación con gráficos en embudo porque no son precisos en un metanálisis de proporciones (Hunter *et al.*, 2014).

2.3.8 Meta-regresión. Para determinar si las características del estudio explicaban parcialmente la heterogeneidad en la ocurrencia estimada de *Mycoplasma*, utilizamos un análisis de metarregresión de efectos aleatorios (Harbord & Higgins, 2008). Construimos varios modelos univariados que incluyen cada covariable y luego seleccionamos aquellas que fueron significativas. Se incluyó la subpoblación aviar, el cuartil de la población aviar de cada país (FAOSTAT, 2020), el año de publicación, el tamaño muestral del estudio, la técnica alternativa utilizada para el diagnóstico (serológico, aislamiento bacteriano, clínico/histológico o molecular), el continente, la latitud, la variación media de temperatura. Además, incluimos los informes oficiales de la concentración media anual de material particulado inferior a 2.5 micrones ($PM_{2.5}$, $\mu g/m^3$) por país (WHO, 2020); elegimos estas partículas como una medida de la exposición a la contaminación ambiental del aire porque este tamaño de partícula penetra profundamente en el tracto respiratorio y por lo tanto, constituye un riesgo para la salud tanto animal como humana (WHO, 2020). Todos los análisis se realizaron con Stata 12 (StataCorp, TX, EUA) y los gráficos se construyeron con *Prism* 9 (GraphPad, Inc., CA, EUA). Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$.

2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1 Selección de estudios. Se recuperaron un total de 2,294 registros de la búsqueda electrónica en la base de datos. Los resúmenes de *Web of Science*, *Science Direct* y *CAB abstract* proporcionaron el 78.2% de los registros. Después de la eliminación de duplicados, quedaron 1,669 registros para la selección según en el título y el resumen, de los cuales se recuperaron 145 publicaciones en texto completo para la evaluación de elegibilidad. Un total de 85 publicaciones cumplieron con los criterios de inclusión y fueron seleccionados para su inclusión en la síntesis narrativa. Estas 85 publicaciones incluyeron 62 y 48 estudios que evaluaron específicamente MG y MS, respectivamente (Figura 1). Entre las 60 publicaciones que fueron excluidas, la falta de la población definida y la ausencia de ocurrencia fueron los principales motivos de exclusión. En el Apéndice web 4 se resume una lista con los motivos principales de exclusión, mientras que las referencias de las 85 publicaciones incluidas en nuestro trabajo se muestran en el Apéndice web 5.

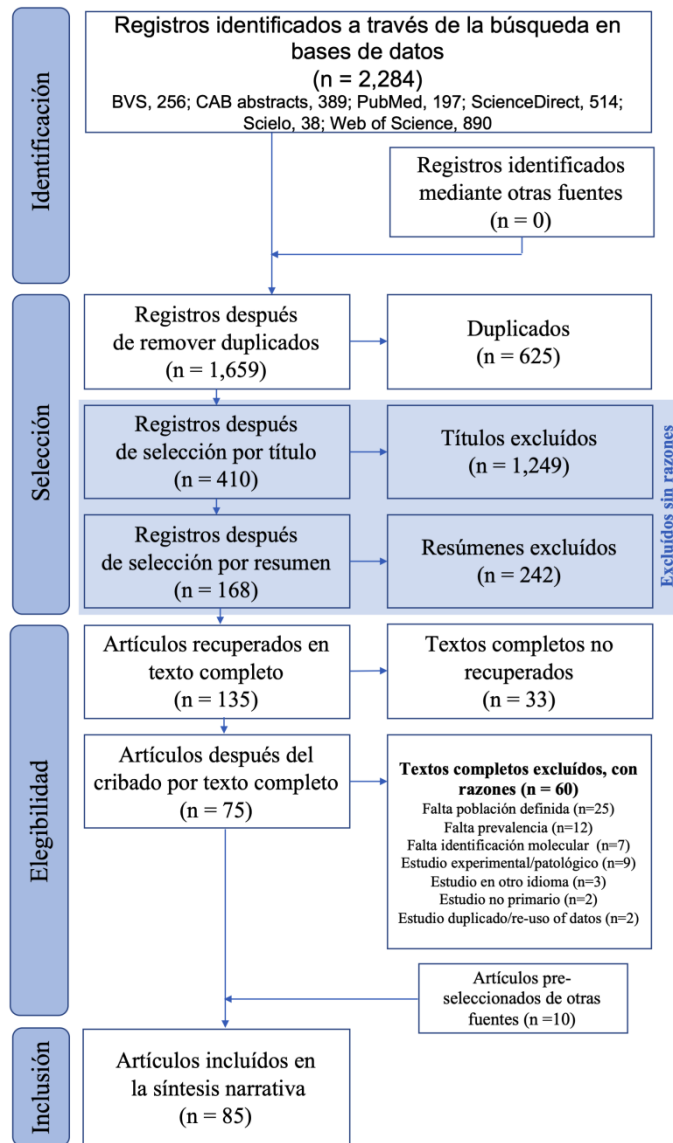


Figura 1. Diagrama de flujo PRISMA para la selección de estudios incluidos en la revisión sistemática y el metanálisis.

2.4.2 Características principales de los estudios. Las 85 publicaciones se realizaron en 33 países distribuidos en las siete regiones de la OMS, principalmente de Asia y Europa (42 y 16 artículos, respectivamente). Pakistán, Irán, Brasil, Egipto y Turquía proporcionaron 40/85 artículos. Los 62 y 48 estudios que evaluaron específicamente MG y MS proporcionaron datos sobre 22,162 y 26,413 muestras de aves, respectivamente, con una mediana para ambas especies de 64 muestras por estudio (25.5 y 190, percentil 25 y 75, respectivamente). Como se resume en el cuadro 5, para ambos patógenos, las publicaciones de la región del Medio Oriente y África del Norte contribuyeron con el

mayor número de estudios (25), seguidas de las publicaciones de la región de Europa y Asia Central (24 estudios) y las publicaciones de la Región de Asia meridional (20 estudios).

Cuadro 5. Ocurrencia mundial, regional y nacional de MG y MS en aves domésticas, estimada a partir de resultados extraídos de 85 publicaciones que incluyeron 110 estudios (62 para MG y 48 para MS).

Región / País de la OMS	Estudios	Positivos / Muestras	Ocurrencia agrupada, MG (IC 95%)	Estudios	Positivos / Muestras	Ocurrencia agrupada, MS (IC 95%)
Global	62	3,935 / 22,162	27.0 (20.4-34.2)	48	19,783 / 26,413	38.4 (23.5-54.5)
Africa Sub-sahariana	4	21 / 72	26.5 (1.6-62.8)	2	13 / 22	61.5 (39.4-81.6)
Etiopía	1	2 / 11	18.2 (2.3-51.8)	1	10 / 11	90.9 (58.7-99.8)
Ghana	1	0 / 20	0.0 (0.0-16.8)			
Sudán	1	8 / 11	72.7 (39.0-93.9)	1	3 / 11	27.3 (6.0-60.9)
Zimbabue	1	11 / 30	36.7 (19.9-56.1)			
Norteamérica	4	105 / 397	22.1 (10.3-36.5)	3	142 / 333	44.6 (33.8-55.6)
Canadá	1	35 / 151	23.2 (16.7-30.7)	1	54 / 151	35.8 (28.1-43.9)
Estados Unidos	3	70 / 246	21.4 (3.9-46.8)	2	88 / 182	48.3 (41.0-55.7)
América Latina y el Caribe	8	107 / 1,340	17.2 (3.1-38.1)	8	584 / 1,528	40.8 (28.8-53.3)
Brasil	7	71 / 1,249	14.3 (1.6-34.6)	7	541 / 1,437	39.7 (26.1-54.1)
Colombia	1	36 / 91	39.6 (29.5-50.4)	1	43 / 91	47.2 (36.7-58.0)
Asia del Sur	13	2,241 / 6,415	37.3 (26.2-48.9)	7	480 / 900	56.0 (34.0-76.9)
Bangladesh				1	219 / 365	60.0 (54.8-65.1)
India	4	151 / 929	28.5 (13.7-45.9)	2	68 / 134	50.7 (42.1-59.4)
Pakistán	9	2,090 / 5,486	40.7 (27.8-54.3)	4	193 / 401	55.7 (14.9-92.3)
Asia oriental y el Pacífico	6	352 / 1,679	23.2 (15.0-32.6)	5	17,503 / 18,702	30.8 (0.0-86.3)
China	2	54 / 213	24.4 (18.8-30.6)		2 17,398 / 18,103	96.8 (96.5-97.0)
Malasia	2	239 / 959	24.7 (21.9-27.5)			
Myanmar	1	6 / 57	10.5 (3.9-21.5)	1	5 / 57	8.8 (2.9-19.3)
Tailandia	1	53 / 450	11.8 (8.9-15.1)	1	71 / 450	15.8 (12.5-19.5)
Taiwán				1	29 / 92	31.5 (22.2-42.0)
Europa y Asia central	12	373 / 9,923	13.9 (6.1-24.0)	12	727 / 3,548	22.9 (16.1-30.7)
Bélgica	1	80 / 7,464	1.1 (0.8-1.3)	1	158 / 1,224	12.9 (11.1-14.9)
Francia	3	48 / 237	18.8 (0.0-57.7)	2	75 / 231	31.5 (25.7-37.8)
Holanda				1	3 / 8	37.5 (8.5-75.5)
Polonia				1	265 / 906	29.2 (26.3-32.3)
Portugal				1	24 / 36	66.7 (49.0-81.4)
Reino Unido	1	43 / 131	32.8 (24.9-41.6)	1	14 / 131	10.7 (5.9-17.3)
Republica checa	1	0 / 45	0.0 (0.0-7.9)	1	2 / 45	4.4 (0.5-15.1)
Rusia	1	20 / 287	17.4 (13.2-22.3)	1	70 / 287	24.4 (19.5-29.8)
Turquía	5	182 / 1,759	17.9 (4.9-36.1)	3	116 / 680	14.2 (5.6-25.9)
Oriente Medio y África del Norte	15	736 / 2,336	37.8 (22.3-54.6)	11	334 / 1,380	37.7 (26.1-50.0)
Arabia Saudita	1	169 / 208	81.2 (75.3-86.3)			
Argelia	1	9 / 9	100.0 (66.4-100)	1	2 / 9	22.2 (2.8-60.0)
Egipto	4	254 / 611	34.9 (14.4-58.9)	2	15 / 18	91.6 (71.7-100)
Irán	4	161 / 772	22.8 (2.7-53.8)	6	261 / 903	37.4 (27.8-47.6)
Irak	1	26 / 38	68.4 (51.4-82.5)			
Israel	1	37 / 183	20.2 (14.6-26.8)			
Jordania	2	48 / 465	9.5 (6.9-12.4)	2	56 / 450	11.8 (8.9-14.9)
Kuwait	1	29 / 50	58.0 (43.2-71.8)			

Un resumen detallado de las principales características por publicación se presenta en los Datos suplementarios 1 y 2 para MG y MS, respectivamente. De los 110 estudios (62 y 48 para MG y MS, respectivamente), 32 incluyeron una subpoblación indefinida, 22 evaluaron pollos de engorda, 17 evaluaron una población mixta, 15 incluyeron gallinas ponedoras, 14 estudios incluyeron reproductores y 10 utilizaron avicultura doméstica diversa. Entre los 110 estudios, PCR, RT-PCR y PCR múltiple fueron las principales técnicas de diagnóstico utilizadas para la detección de *Mycoplasma* (74, 19 y 7 estudios, respectivamente). Mientras que las principales regiones genómicas objetivo fueron: ARNr 16S, 48 estudios; gen *mgc2*, 16 estudios; gen *vlhA*, 15 estudios; kits comerciales, 13 estudios; gen *Lp*, 7 estudios; gen *gapA*, 2 estudios; y otros, 9 estudios.

2.4.3 Evaluación del riesgo de sesgo. Entre las 85 publicaciones, el 18.8% de los estudios tuvo alto riesgo de sesgo por no presentar una técnica alternativa para el diagnóstico de micoplasmosis, así como el 17.6% de los estudios fueron evaluados con alto riesgo de sesgo por no incluir una definición adecuada de la población y el 16.5% de los estudios con un alto riesgo de sesgo por la notificación selectiva de los resultados (Apéndice web 6).

2.4.4 Ocurrencia mundial, regional y nacional de infección por MG y MS en aves domésticas. En general, la ocurrencia global agrupada de MG fue de 27.0% (IC del 95%, 20.4-34.2) en 62 estudios con una prueba significativa del tamaño del efecto ($z = 12.3$, $p=0.00$), heterogeneidad significativa entre los estudios ($X^2=6,836.3$, $gl=61$; $p=0.00$) y una proporción significativa de variación atribuible a la heterogeneidad según el valor de I^2 del 99.1% ($p=0.00$). Para MS, la ocurrencia global agrupada se estimó en 38.4% (23.5-54.5) en 48 estudios con una prueba significativa del tamaño del efecto ($z=7.4$, $p=0.00$) y evidencia de heterogeneidad significativa entre los estudios según la estadística X^2 (16,859.9, $gl=47$; $p=0.00$) con un 99.7% de variación atribuible a la heterogeneidad (I^2 , $p=0.00$). Como se resume en el cuadro 5, en las siete regiones de la OMS, la ocurrencia de MG fue más alta en Asia del Sur (37.3%, 26.2-48.9) y más baja en Europa y Asia Central (13.9%, 6.1-24). Para MS, la ocurrencia fue más alta en África subsahariana (61.5%, 39.4-81.6) y más baja en Europa y Asia central (22.9%, 16.1-30.7).

A nivel nacional, la ocurrencia de ambos patógenos mostró un patrón de distribución muy heterogéneo que varió según el país y el patógeno (Figura 2b). Por ejemplo, Argelia y

Sudán tuvieron valores de ocurrencia más altos para MG que para MS, mientras que China, Egipto y Etiopía mostraron valores más altos para MS que para MG. Como se muestra en la Figura 2a, los cinco primeros países con mayor ocurrencia de MG fueron Argelia (100%), Arabia Saudita (81.2%), Sudán (72.7%), Irak (68.4%) y Kuwait (58%). Mientras tanto, para MS los países posicionados entre los cinco primeros fueron China (96.8%), Egipto (91.6%), Etiopía (90.9%), Portugal (66.7%) y Bangladesh (60%). La ocurrencia fue similar y por debajo del promedio mundial en la República Checa (0.0% y 4.4%), Jordania (9.5% y 11.8%), Myanmar (10.5% y 8.8%), Tailandia. (11.8% y 15.8%) y Turquía (17.9% y 14.2%) para MG y MS, respectivamente.

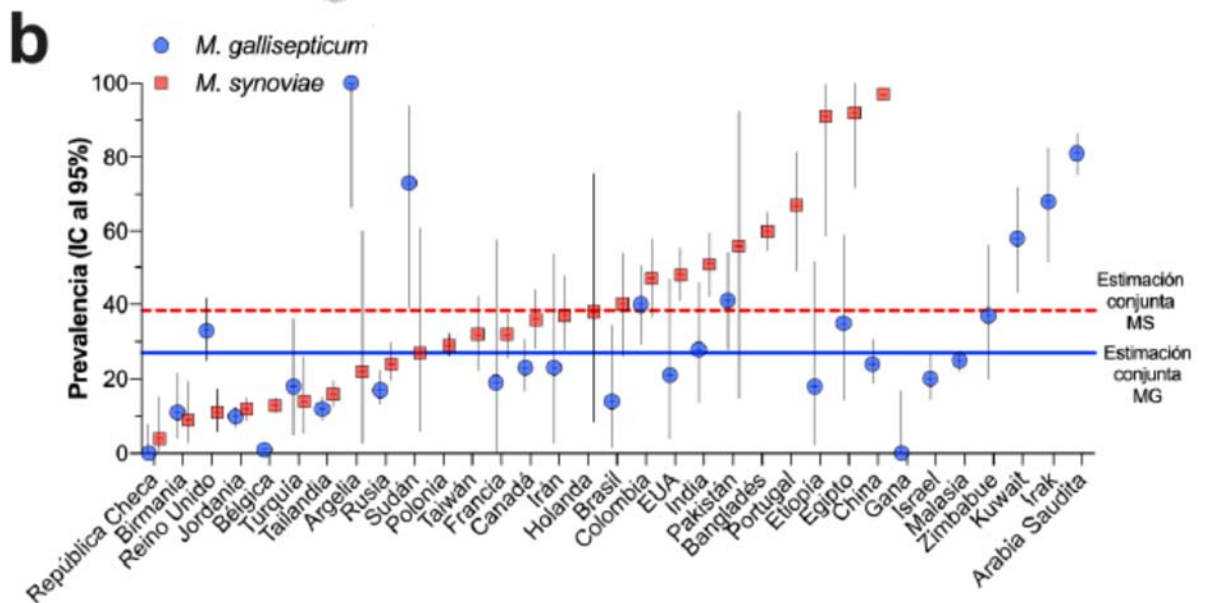
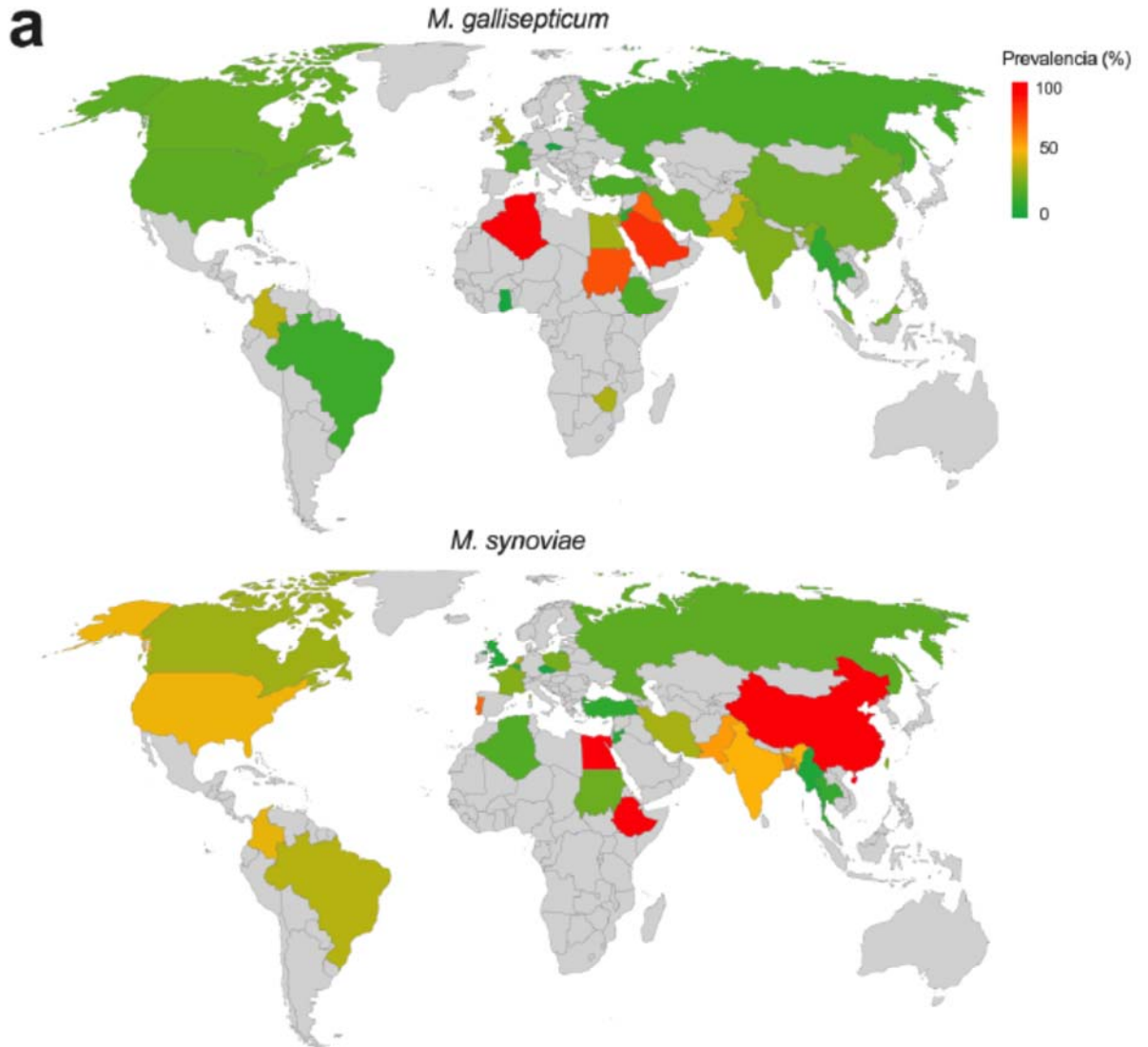


Figura 2. a) Distribución espacial de la ocurrencia estimada por patógeno y b) ocurrencia nacional estimada e IC del 95% para MG y MS.

2.4.5 Ocurrencia según la subpoblación de aves domésticas. En el análisis de subgrupos según las subpoblaciones de aves domésticas, la ocurrencia combinada de MG mostró menos variación entre las cinco categorías que varió entre 11.9% y 31.9% (Figura 3a). En contraste, la ocurrencia combinada encontrada para MS mostró una amplia heterogeneidad de acuerdo con un rango de 20.1% a 62.6% entre las cinco subpoblaciones (Figura 3b). Además, la avicultura diversa mostró la ocurrencia más baja para MG (11.9%, 1.9-26.5) y para MS (20.1%, 8.8-33.7), mientras que MS fue altamente prevalente en reproductores (62.6%, 30.2-90.5) y MG tuvo la mayor ocurrencia en gallinas ponedoras según una ocurrencia combinada de 31.9% (14.2-52.3%). En el Apéndice web 7 y 8 se muestran los diagramas de bosque para MG y MS, respectivamente.

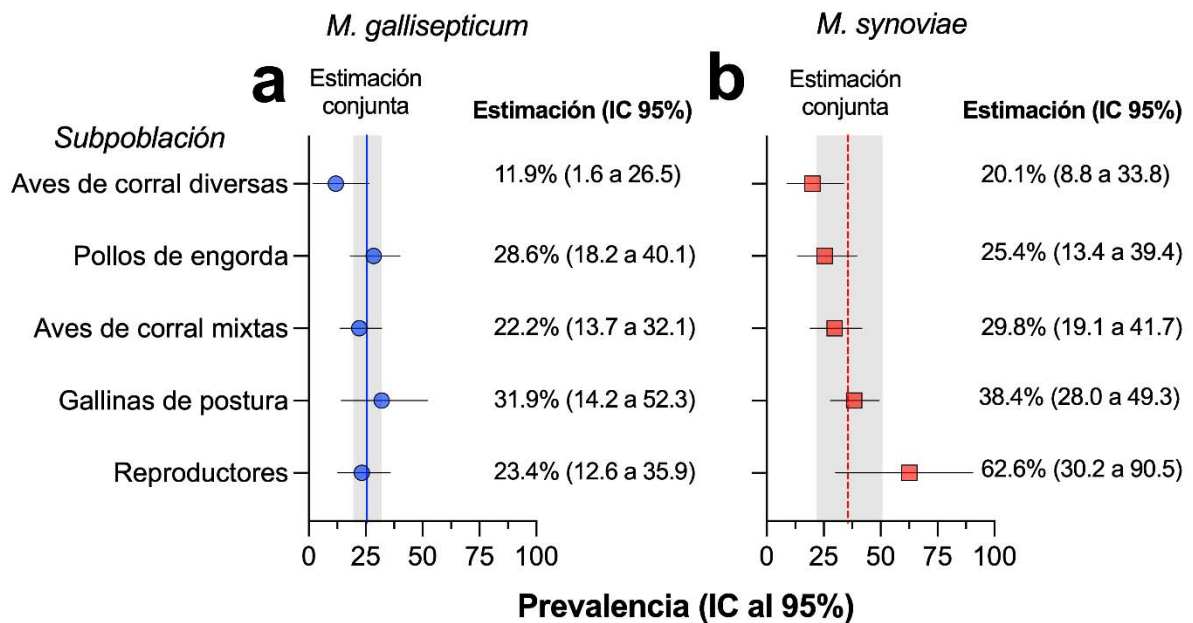


Figura 3. Estimaciones de ocurrencia con IC del 95% por subpoblación para a) *M. gallisepticum* y b) *M. synoviae*.

2.4.6 Impacto de covariables seleccionadas en la ocurrencia. Antes de comentar estos resultados, debemos aclarar que las variables incluidas en la metarregresión no deben interpretarse como factores de riesgo causales de infección, sino como covariables que podrían explicar parte de la heterogeneidad observada en las

estimaciones (Lean *et al.*, 2009). Para MG, el análisis de meta-regresión mostró que tanto el año de publicación del estudio (Coeficiente=0.013, $p=0.05$; Figura 4a) como la exposición a la contaminación ambiental del aire medida como la concentración de $PM_{2.5}$ $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ($C=0.004$, $p=0.000$; Figura 4b) tuvieron una significativa asociación positiva con la ocurrencia. En consecuencia, la ocurrencia de MG fue mayor en estudios más recientes o países con un mayor nivel de exposición a la contaminación ambiental del aire. En contraste, encontramos una tendencia decreciente significativa en la ocurrencia de MG a medida que aumentaba el tamaño de la muestra del estudio ($C=-0.0002$, $p=0.015$; Figura 4b). Asimismo, para MS hubo una asociación positiva entre el valor de ocurrencia y el nivel de contaminación atmosférica ($PM_{2.5}$, $\mu\text{g}/\text{m}^3$) en el país donde se realizó el estudio ($C=0.0032$, $p=0.05$; Figura 4d). En el resto de las covariables, no encontramos una asociación significativa con la ocurrencia estimada de MG o MS.

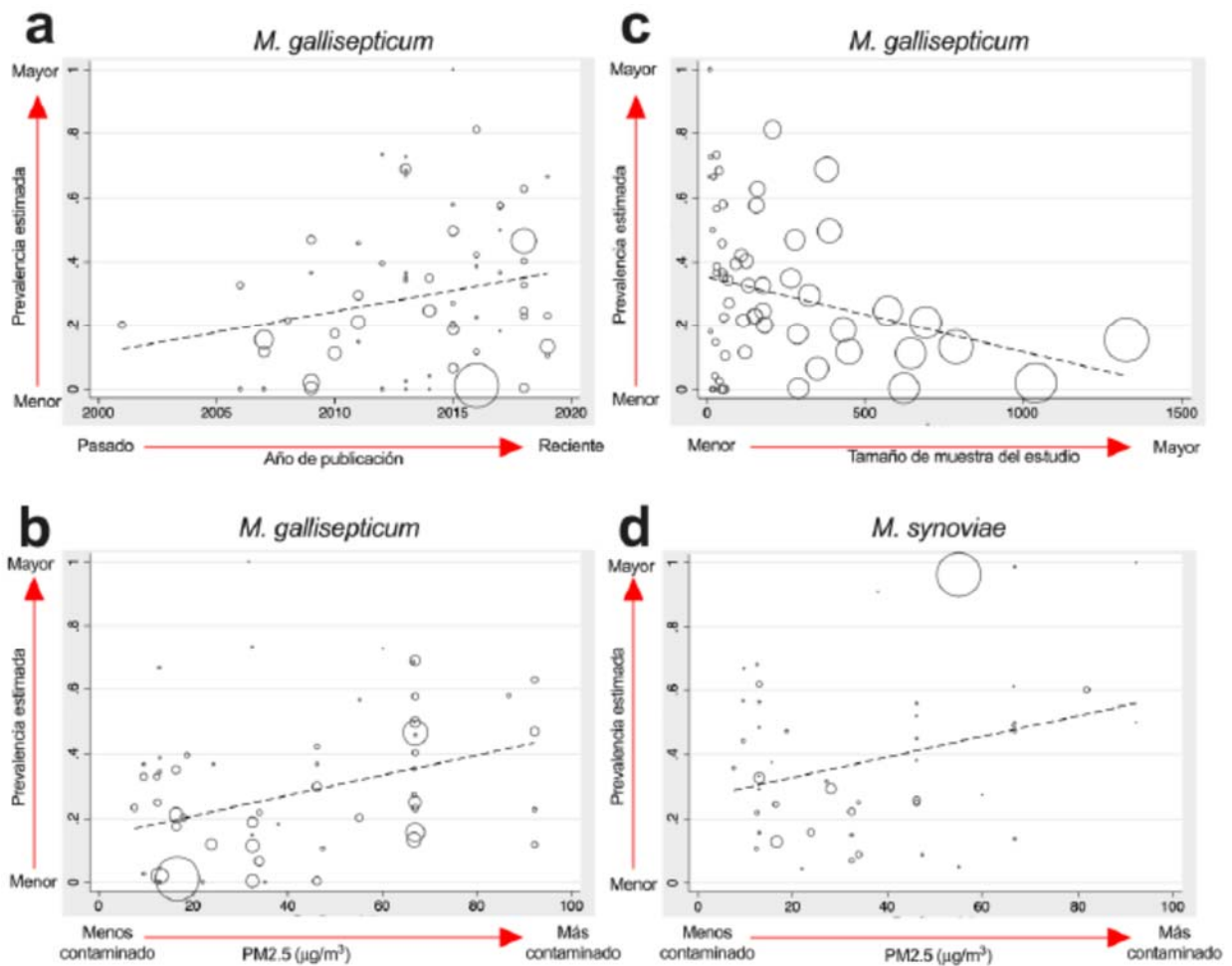


Figura 4. Resultados del análisis de metarregresión según a) año de publicación para MG, b) nivel de contaminación atmosférica (PM_{2.5}, µg/m³) para MG, c) tamaño de muestra evaluado por estudio para MG y d) nivel de contaminación atmosférica (PM_{2.5}, µg/m³) para MS. ES = tamaño del efecto (tasas de ocurrencia). Se incluyeron solo covariables significativas para cada patógeno.

2.4.7 Resumen e implicaciones de la evidencia de la ocurrencia de MG y MS. En nuestro estudio, encontramos una ocurrencia global de 27.0% para MG y 38.4% para MS. Según estos resultados y teniendo en cuenta la población avícola actual (FAOSTAT, 2020), estimamos que al menos 7,830 y 11,136 millones de aves podrían ser portadores de MG y MS en el mundo, respectivamente. Nuestros resultados revelaron un patrón heterogéneo de ocurrencia que varió según la especie de *Mycoplasma* y el nivel de agregación (regional o nacional). De hecho, encontramos que la ocurrencia global de MS fue mayor que de MG, coincidiendo así con estudios previos (Koehn *et al.*, 2009; Mettifogo *et al.*, 2015; Rajkumar *et al.*, 2018) pero discrepamos con otros que han demostrado la tendencia opuesta (Atta ur *et al.*, 2018; Ball *et al.*, 2018; Tomar *et al.*, 2017).

MG y MS tuvieron la ocurrencia combinada más baja (13.9% y 22.9%, respectivamente) en estudios de la región de Europa y Asia Central. En contraste, los estudios de la región de Asia del Sur y África subsahariana tuvieron la mayor ocurrencia de MG (37.3%) y MS (61.5%), respectivamente. La mayor ocurrencia de MS observada en África subsahariana podría estar relacionada con una mayor transmisión vertical, que es la ruta de transmisión más importante de MS en parvadas de pollitas ponedoras (Ter Veen *et al.*, 2020). Por el contrario, la menor ocurrencia observada para MG podría explicarse parcialmente debido al uso de vacunas vivas atenuadas (El Gazzar *et al.*, 2011; Ferguson-Noel & Williams, 2015).

Los resultados del análisis de subgrupos revelaron que la avicultura diversa tuvo la ocurrencia combinada más baja de micoplasmosis (11.9% para MG y 20.1% para MS) entre las cinco categorías de subpoblaciones. Tal resultado podría estar asociado con las prácticas de producción para esta categoría, como una menor densidad de aves, un hábitat menos hacinado y condiciones estresantes reducidas en comparación con las aves comerciales. Por el contrario, la subpoblación de reproductores se vio afectada en

gran medida por MS según una ocurrencia estimada del 62.6%, que contrasta con el 23.4% estimado para MG. La alta ocurrencia de MS en los reproductores podría deberse a la alta concentración de granjas de reproductores en algunas regiones junto con la falta de barreras sanitarias (Moreira *et al.*, 2017). Además, la mayor vida productiva de las parvadas de ponedoras y reproductoras también podría aumentar la posibilidad de contraer la infección por *Mycoplasma* en el campo (Gharaibeh & Al Roussan, 2008), porque la presión de infección aumenta lentamente debido a la acumulación de bacterias patógenas en el medio ambiente (Feberwee *et al.*, 2017). Posiblemente, se podrían explorar varias prácticas de manejo y sanidad de las subpoblaciones avícolas en una revisión sistemática de los factores de riesgo extrínsecos e intrínsecos asociados con la infección por MG y MS (de Sa *et al.*, 2015); dicha información permitirá una mejor comprensión de las diferencias observadas en la ocurrencia entre estos grupos. A continuación, discutimos algunos de los aspectos que podrían explicar parcialmente las diferencias observadas en los patrones epidemiológicos de estos dos patógenos.

El método de control preferido es el mantenimiento de parvadas libres de MG y MS y la vacunación debe considerarse solo en granjas de edades múltiples donde la infección es inevitable (OIE, 2019). Sin embargo, en las áreas donde la erradicación completa es difícil, se utilizan vacunas vivas como estrategia de control alternativa. Actualmente, hay tres vacunas vivas aprobadas comercialmente contra MG (cepa 6/85, ts-11 y cepa F) y una cepa K que se ha probado en algunos estudios (Ishfaq *et al.*, 2020). Para MS, la vacunación se realiza especialmente en reproductoras y ponedoras con dos vacunas vivas atenuadas disponibles (Kaboudi & Jbenyeni, 2019). En cuanto al uso de antibióticos, no es una medida de control adecuada porque este tipo de tratamiento no elimina las infecciones por micoplasmas (Buim *et al.*, 2009). Sin embargo, se necesitan más estudios para evaluar si la eficacia de las tres formas principales de control de la micoplasmosis varía según la subpoblación de aves domésticas o el país (Ferguson-Noel & Williams, 2015; Kleven, 2008) y cómo cada estrategia impacta de manera diferente en la ocurrencia de estos patógenos.

Aunque tanto MG como MS son patógenos de declaración obligatoria a la Organización Mundial de Sanidad Animal [OIE], MS se añadió más tarde en 2008 al manual de pruebas de diagnóstico y vacunas para animales terrestres (OIE, 2019). Posiblemente, esto

podría haber contribuido a las variaciones regionales y nacionales en la ocurrencia de ambos patógenos, principalmente debido a las disparidades en los esquemas utilizados para controlar estas dos especies de *Mycoplasma*. Las medidas de control para MG comenzaron a principios de las décadas de 1950 y 1960, mientras que las medidas de control para MS han sido más estrictas durante las últimas dos décadas. En Holanda, el control y erradicación de MG comenzó a mediados de los años 60 en reproductoras de pollo de engorda y se expandió gradualmente a ponedoras y pavos (Landman, 2014). En Brasil, la reducción de MG comenzó en 1980 y fue impulsada por el establecimiento del Programa Nacional de Salud Aviar, mientras que en las gallinas ponedoras el uso de la vacuna contra MS es todavía muy limitado y para las granjas de reproductoras que participan en el programa, la vacunación no está permitida y se eliminan todas las parvadas infectadas (Buim *et al.*, 2009). En el Reino Unido, la infección con ambas especies ahora se controla mediante la vacunación (Ball *et al.*, 2018). A pesar de las políticas adoptadas para el control de MG en EUA, las medidas han demostrado ser ineficaces y por lo tanto, han mantenido a este país como una ruta relevante para la diseminación de MG (De la Cruz *et al.*, 2020). De hecho, Tomar *et al.* (2020) encontraron que los aislamientos de MG encontrados en aves domésticas de la India se agruparon con la cepa de EUA, un resultado que sugiere que la cepa de MG de América del Norte podría estar ya circulando en la región de Haryana de este país. En las granjas avícolas iraníes, los intentos de erradicar la infección por MG comenzaron antes que para MS (Pourbakhsh *et al.*, 2010). Se han llevado a cabo programas voluntarios de erradicación y control de MS en algunos países como EUA y el Reino Unido, mientras que la industria avícola holandesa implementó en 2013 un programa obligatorio de control y erradicación de MS para todas las categorías de aves domésticas, excepto los pollos de engorda (Feberwee *et al.*, 2017). El monitoreo de *Mycoplasma* está dirigido a granjas de reproductores y ponedoras comerciales y los programas nacionales de certificación han contribuido al control de las infecciones por *Mycoplasma* en muchos países, aunque los programas implementados varían ampliamente entre países, regiones y granjas (Kaboudi & Jbenyeni, 2019).

Antes del año 2000, MS se asociaba principalmente con infecciones respiratorias subclínicas y se consideraba que tenía un bajo impacto clínico y económico en los pollos

de engorde (Feberwee *et al.*, 2008). Sin embargo, la alta ocurrencia de MS que se muestra en nuestras estimaciones junto con la capacidad de MS para inducir una disminución en la producción de huevos (Stipkovits & Kempf, 1996), la aparición de cepas más virulentas que podrían actuar sinérgicamente con otros patógenos para inducir una enfermedad más grave (Landman, 2014) destacan la importancia de la infección por MS y evidencia la necesidad de mejorar las medidas de control donde no están siendo efectivas, dada la alta ocurrencia de estos patógenos aviares.

De acuerdo con la OIE (2019), debido a la falta de especificidad y sensibilidad encontrada en las pruebas serológicas comunes, se recomienda monitorear parvadas en lugar de analizar aves individuales. En nuestro estudio, cuando los estudios informaron datos a nivel individual y de parvada, elegimos datos a nivel individual porque encontramos una estimación más consistente y precisa en comparación con los datos a nivel de parvada. Después de comparar las estimaciones encontradas en cada nivel, encontramos una discrepancia superior al 15% entre los niveles para reproductores (MG y MS) y ponedoras (MS) (apéndice web 9-11), mientras que las estimaciones restantes fueron bastante consistentes. Aunque identificamos una fuente potencial de variación para estas estimaciones, ambos niveles de muestreo representan una frecuencia aparente y es de esperar una sobreestimación en la ocurrencia a nivel de parvada dado que se requiere encontrar una sola ave positiva para definir una parvada como positiva. Por lo tanto, se necesitan más estudios en cada nivel para realizar más comparaciones y establecer si se deben preferir las pruebas individuales o de parvada para los métodos moleculares.

Además, identificamos tres causas potenciales que podrían haber contribuido a la heterogeneidad de las estimaciones agrupadas. Primero, la disparidad en el número de conjuntos de datos recopilados en las regiones de la OMS. La región de Asia oriental y el Pacífico contribuyó con la mayor proporción (44.8%) de conjuntos de datos, seguida de Europa y Asia central (29.7%). En contraste, África subsahariana (0.2%) y América del Norte (1.6%) proporcionaron una proporción limitada de conjuntos de datos. En segundo lugar, para algunos países hubo un número limitado de publicaciones para las estimaciones; en consecuencia, esta falta de conjuntos de datos podría causar parte de la heterogeneidad porque, para algunos países, las estimaciones se limitaron a un único

conjunto de datos. En tercer lugar, la diversidad de condiciones de salud/enfermedad de las aves evaluadas en cada estudio (es decir, enfermas, mixtas, sanas/enfermas, desconocidas y sanas) evitó identificar una diferencia clara entre las aves sanas y enfermas (principalmente en MS). Sin embargo, realizamos un metanálisis adicional para comparar la ocurrencia de MG y MS entre los estudios que tomaron muestras de aves enfermas y las estimaciones generales. Los resultados mostraron que en los estudios que tomaron muestras de aves enfermas, la ocurrencia de MS (36.53%, 21.25-53.11) y MG (27.95%, 21.47-34.84) fue muy similar con respecto a las estimaciones globales para MS (38.4%) y MG (27.0%). Sin embargo, se esperaría que la frecuencia molecular de la micoplasmosis sea mayor en las aves enfermas, que tienen antecedentes de enfermedades respiratorias o que son seropositivas para los patógenos, en contraste con las aves sanas o cuyo estado de salud se desconoce. En consecuencia, se necesitan más estudios que comparen la ocurrencia de estos patógenos en grupos de aves con diferentes estados de salud/enfermedad.

Solo se incluyeron estudios que evaluaron la presencia de micoplasmosis con un enfoque molecular. La PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR), se utiliza con frecuencia para la detección de agentes infecciosos porque proporciona un ensayo de tubo cerrado sensible y seguro con información cuantitativa que no está disponible en la PCR convencional u otros métodos de amplificación de "punto final". La capacidad cuantitativa de qPCR permite la distinción de niveles subclínicos de infección (cualitativamente positivo por PCR convencional) de niveles más altos con consecuencias patológicas (Buckingham, 2019). Sin embargo, existe una gran discrepancia entre los laboratorios con respecto a su capacidad para detectar el micoplasma por PCR (Hess *et al.*, 2007), por lo que las tasas de ocurrencia podrían estar sobrestimadas o subestimadas. Si bien las pruebas serológicas por sí solas no son suficientes para la detección de micoplasmosis aviar, principalmente porque los anticuerpos permanecen durante mucho tiempo después de la infección (OIE, 2019), es importante contrastar el patrón de ocurrencia molecular que reportamos en este estudio con los perfiles de seroprevalencia reportados en otros estudios; especialmente de países cuyas estimaciones de ocurrencia de *Micoplasma* fueron extremas, tuvieron un tamaño de muestra pequeño o informaron un número limitado de estudios moleculares.

Nuestra revisión sistemática y metanálisis de la ocurrencia molecular de MG y MS en aves domésticas se suma a estudios secundarios previos publicados recientemente para MG y MS en aves domésticas (Yadav *et al.*, 2021) y MG en aves silvestres (Sawicka *et al.*, 2020). En el estudio de Yadav *et al.* (2021), los autores resumen los estudios epidemiológicos basados en pruebas moleculares y serológicas para la detección del patógeno, destacando la importancia económica, el diagnóstico y la prevención y el control de la micoplasmosis aviar con un enfoque especial en la India. De acuerdo con nuestros resultados, los autores encontraron una amplia variabilidad en la aparición de micoplasmosis aviar a nivel mundial e informan la variabilidad en las áreas geográficas de la India. Además, los autores enfatizan el uso de varias prácticas de bioseguridad y manejo que incluyen la adquisición de huevos fértiles y pollitos libres de *Mycoplasma*, la vigilancia epidemiológica continua de las parvadas y el sacrificio de aves positivas como medidas para prevenir nuevas infecciones y la propagación de la micoplasmosis aviar. Sawicka *et al.* (2020) metaanalizaron la ocurrencia de MG en aves silvestres según con tres técnicas de detección diferentes (serología, cultivo y molecular) y encontraron variabilidad en las estimaciones de estas técnicas, así como una amplia distribución del patógeno en 56 especies de aves que podrían servir como reservorios potenciales. Nuestro trabajo incluyó 62 y 48 estudios para MG y MS que, en conjunto, evaluaron más de 48,500 muestras recolectadas en 33 países de las siete regiones de la OMS. Para mejorar la confiabilidad y la confianza en nuestros hallazgos, utilizamos procedimientos metodológicos y estadísticos rigurosos para estimar la ocurrencia e incluimos publicaciones que en la mayoría fueron juzgadas con bajo riesgo de sesgo. En consecuencia, la evaluación de la calidad del conjunto general de evidencia se calificó como de alta calidad según el sistema GRADE (Balshem *et al.*, 2011). Nuestro mapeo de las regiones de la OMS y los países de alta ocurrencia de MG y MS podría proporcionar más orientación sobre dónde enfocar las medidas personalizadas destinadas a reducir la frecuencia de micoplasmosis aviar. Además, la identificación de las subpoblaciones de aves domésticas con mayor riesgo junto con las opciones de control de la micoplasmosis (Bennett *et al.*, 2013) debería aumentar el éxito en el esfuerzo por erradicar esta infección.

2.4.8 Limitaciones del estudio. Los resultados de esta revisión deben interpretarse con cautela, teniendo en cuenta las siguientes limitaciones: 1) aunque este metanálisis global de la ocurrencia de infección por MG y MS en aves domésticas es el más grande hasta el momento, solo fueron incluidos estudios elegibles publicados de un número reducido de países. Por lo tanto, estas estimaciones podrían no ser representativas para varias naciones y justifica la necesidad de realizar futuros estudios en más países; 2) el análisis de subgrupos no redujo la heterogeneidad entre los estudios y la fuente de esta heterogeneidad no se pudo identificar según el análisis moderador porque para MG solo 3/9 covariables evaluadas (año de publicación, tamaño de muestra y exposición a la contaminación ambiental del aire) se asociaron significativamente con la ocurrencia, mientras que para MS solo la exposición a la contaminación ambiental del aire fue significativa; además, no incluimos el estado de vacunación debido a la escasez de datos, ya que solo ocho estudios informaron antecedentes de vacunación y ocho estudios más no informaron vacunación en aves domésticas y 3) la diversidad en las condiciones y procedimientos de laboratorio para evaluar la presencia de micoplasmosis aviar es una causa común de heterogeneidad entre los estudios.

2.5 CONCLUSIONES

Los resultados de este metanálisis demuestran que un tercio de las aves domésticas en el mundo podrían tener una alta probabilidad de infección por MS y una cuarta parte de las aves domésticas del mundo podrían estar infectadas con MG, principalmente en las regiones de Asia del Sur y Oriente Medio y África del Norte para la MG y la región del África subsahariana para MS. Por lo tanto, la necesidad de prevenir y controlar las infecciones por *Mycoplasma aviar* sigue siendo una prioridad para la industria avícola. La ocurrencia estimada del 38.4% de la infección por MS debería servir como recordatorio para los expertos en salud animal y los responsables políticos sobre la necesidad de replantear las medidas de control en algunos países donde los programas de intervención no se han implementado o han sido ineficaces para este patógeno. La serie de resultados presentados en nuestra revisión justifica la necesidad de mejorar el sistema de detección temprana y replantear las medidas de control para reducir la propagación de los patógenos aviares, tanto MG como MS.

CAPÍTULO 3. Identificación y ocurrencia molecular de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* en aves ponedoras comerciales de Sinaloa y Sonora, México

3.1 RESUMEN Y ABSTRACT

La avicultura es un sector estratégico en México por la importancia de los productos avícolas para la alimentación. Sin embargo, las infecciones por MG y MS pueden causar mortalidad en aves, escasa ganancia de peso corporal, deficiente conversión alimenticia y aumento de los decomisos de canales, así como caídas en la producción y calidad de huevos en aves ponedoras y reproductoras. Éste trabajo presenta un estudio de campo observacional descriptivo de carácter epidemiológico que tuvo como objetivo demostrar la detección molecular de MG y MS en aves ligeras ponedoras comerciales del noroeste de México. Se recolectaron 89 muestras individuales de hisopos traqueales de aves ponedoras comerciales sospechosas de micoplasmosis en los estados de Sinaloa y Sonora, México. El ADN se extrajo por lisis térmica sumergiendo los hisopos en 0.5-1 mL de PBS, centrifugados a 13,000 rpm durante 30 min, ~80 mL de sedimento fue disuelto en 50 µL de agua desionizada, se calentó a 95-100 °C durante 20-30 min, luego -20 °C durante 10 min, se centrifugó el lisado a 13,000 rpm durante 5 min y se recogió sobrenadante (ADN). La detección de MG y MS se llevó a cabo mediante la amplificación de los genes de ARN ribosomal 23S y 16S, respectivamente, utilizando dos enfoques moleculares; amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para LAMP, 6.5 µL de agua destilada, 1 µL de mezcla de oligonucleótidos MG ARNr 23S o MS ARNr 16S (40 µM de FIP y BIP y 5 µM de F3 y B3), 4.0 µL de mezcla maestra ADN polimerasa Bst 2.0 *WarmStart* y 1 µL del sobrenadante (plantilla de ADN) se incubaron a 64-67 °C por 100-120 min. Los resultados muestran una estimación conjunta agrupada por LAMP y PCR de 33.31% de infección por MG y de 20.96% por MS, con coinfección en 8.99% y 7.87% de las muestras detectadas por LAMP y PCR, respectivamente. El ADN extraído por lisis térmica fue adecuado para la detección molecular de MG y MS, como lo corroboró el análisis de secuencias amplificadas de muestras de campo con los nuevos oligonucleótidos LAMP ARNr 23S y 16S. La presencia de MG y

MS fue confirmada por medios moleculares en los seis sitios de muestreo en el noroeste de México, lo que sugiere la urgencia de replantear las medidas de control (tal como vacunas vivas aprotógenas de MG y MS para pollitas ponedoras) para minimizar la propagación de estos patógenos primarios.

Palabras clave: Amplificación isotérmica; Avicultura comercial; Detección molecular; Extracción térmica; Micoplasmosis aviar

3.2 INTRODUCCIÓN

México es actualmente el sexto lugar en producción de pollo y cuarto productor de huevo a nivel mundial. En 2021, la industria avícola de México produjo 3.79 millones de toneladas de carne y más de 3.14 millones de toneladas de huevo. A nivel estatal, Sonora es el tercer productor de huevo (8.3%) y Sinaloa octavo productor de huevo (3%) y décimo productor de pollo (4%). Para el cierre de 2022, se estima un crecimiento del 3% en la producción avícola nacional respecto a 2021. Éstos indicadores destacan la importancia de los productos avícolas para la alimentación, mostrando a la avicultura como uno de los sectores estratégicos más importantes en México (UNA, 2022). A pesar de esto, las enfermedades respiratorias todavía representan un desafío importante para la industria, ya que las infecciones subclínicas y clínicas causan pérdidas sustanciales de producción (Ball, Forrester & Ganapathy, 2018). Los micoplasmas pertenecen a la división Firmicutes, a la clase Mollicutes, orden Mycoplasmatales, familia Mycoplasmataceae, género Mycoplasma (Organización Mundial de Sanidad Animal [OIE], 2019). Los Mollicutes son los procariontes autorreplicantes más pequeños sin paredes celulares y a excepción de las infecciones adquiridas por transmisión del huevo, las vías respiratorias superiores y/o la conjuntiva son las puertas de entrada para las infecciones por MG adquiridas naturalmente (Ley, 2008). Las proteínas unidas a la membrana de MG, GapA y CrmA, son factores clave de virulencia desde la adherencia hasta la colonización, así como el inicio y la gravedad del desarrollo de lesiones en el epitelio traqueal (Rüger, Szostak & Rautenschlein, 2022). Tras la invasión de las células eucariotas, se produce una transición de fase (cambios a nivel proteómico, genómico y

metabólico) del patógeno aviar MG, incluida la proteína reguladora SpxA como un regulador importante para la adaptación de MG a un entorno intracelular (Matyushkina *et al.*, 2016). Esta capacidad de invasión de células no fagocíticas contribuye a la diseminación sistémica de MG desde el tracto respiratorio hasta los órganos internos (Vogl *et al.*, 2008). Además, los subproductos del micoplasma, como el peróxido de hidrógeno y los radicales superóxido, junto con las citocinas inflamatorias pueden exacerbar la enfermedad (Umar *et al.*, 2017). Además, los micoplasmas tienen enzimas (cisteína proteasa CysP) que pueden escindir la IgG del huésped como estrategia para una supervivencia prolongada a pesar de la respuesta de anticuerpos de su huésped (Cizelj *et al.*, 2011). La micoplasmosis aviar causa enormes pérdidas a la industria avícola, cuyo impacto se estima en una reducción del 10 al 20% en la ganancia de peso corporal, en la eficiencia de conversión alimenticia y en el desecho de canales y una tasa de mortalidad del 5 al 10% en pollos y aumento del 5 al 10% de la mortalidad embrionaria por infección de MG; sin embargo, la infección por MS provoca una inmunosupresión transitoria, un aumento del 1 al 4% en la mortalidad de los pollos y una disminución del 5 al 10% en la producción e incubabilidad del huevo en ponedoras y reproductoras (Yadav *et al.*, 2021). MG se considera la principal causa de enfermedad respiratoria crónica (ERC), en la que otros organismos causan con frecuencia complicaciones con aerosaculitis grave que es el resultado de infección por MG o MS, además de complicaciones por patógenos como virus respiratorios (p. ej., bronquitis infecciosa o enfermedad de Newcastle) y por lo general *Escherichia coli* y tiende a ser más grave y de mayor duración en los meses fríos y afecta a las aves más jóvenes con mayor severidad que a las aves adultas (Ley, 2008). Por estas razones, se necesitan más estudios de vigilancia continua para identificar la presencia de estos agentes patógenos en las parvadas a nivel local y regional (Hutton *et al.*, 2017). Previos reportes de micoplasmas en México reflejan resultados por serología de 0% para MG y MS en aves silvestres del Noreste de México (Aguirre *et al.*, 1992), 72.2% para MG y 22.2% para MS en guajolotes de traspatio de Oaxaca (Camacho-Escobar *et al.*, 2009) y 78% para MG y 91% para MS en aves de combate del altiplano central (Talavera-Rojas *et al.*, 2012). Aunque MS ha sido aislada con mayor frecuencia que MG en reproductoras pesadas y gallinas ponedoras en el Centro, Occidente y Sureste de México y se identificaron

mediante amplificación aleatoria de ADN polimórfico 24/28 cepas de MS que coinciden con la cepa vacunal MS-H y 3/12 cepas de MG con la cepa vacunal MG-F, no se ha logrado tipificar a las cepas de campo distintas a las cepas vacunales (Petrone-Garcia *et al.*, 2020); por lo tanto, varios genotipos circulantes de MG y MS son completamente desconocidos, específicamente en el Noroeste de México.

El ADN genómico extraído por centrifugación con choque térmico se obtiene unido a material celular y proteínas desnaturalizadas y por tanto no está completamente expuesto para ser detectado por electroforesis, por lo que no se observan bandas que indiquen la presencia de ADN. Sin embargo, tras la amplificación por PCR del ADN extraído por estos métodos, se observa la presencia del producto amplificado (Hernández *et al.*, 2009). En el estudio actual, investigamos la presencia de importantes micoplasmas de aves domésticas (MG y MS) en muestras que se recolectaron de parvadas de aves ponedoras comerciales con antecedentes de signos respiratorios. Se utilizaron técnicas moleculares con oligonucleótidos dirigidos a los genes ARNr 23S y 16S y *mgc2*, así como *vihA* y ARNr 16S para identificar MG y MS, respectivamente y detectar la posible cocirculación de ambos patógenos en aves ponedoras de granjas de Sinaloa y Sonora, México.

El gen ARNr 16S tiene dos copias en los genomas de MG y MS y posee alta sensibilidad porque tiene regiones altamente conservadas (Hess, Neubauer & Hackl, 2007) y es el gen más ampliamente usado para detección molecular de MG y MS (Cháidez-Ibarra *et al.*, 2021). Las secuencias del gen ARNr 23S tienen una distribución alternada de segmentos altamente conservados y variables en todo el *locus* del gen, con un segmento variable en el dominio central de considerable diversidad de secuencia con sitios discriminatorios (Schnee *et al.*, 2012). El gen de virulencia *mgc2* de MG es muy apto para amplificar el genoma de MG y es el segundo gen más ampliamente usado para detectar y caracterizar diferentes cepas de campo de MG (Cháidez-Ibarra *et al.*, 2021), codifica la proteína de superficie MGC2 relacionada con la citoadherencia y se utiliza para el genotipado por su variabilidad genética (Gharaibeh *et al.*, 2011). De la Cruz *et al.* (2020) señalan al gen *mgc2* como un marcador filogenético, filodinámico y filogeográfico confiable útil en estudios de epidemiología molecular. El gen de virulencia *vihA* de MS es el segundo gen usado más ampliamente para detectar y caracterizar diferentes cepas

de campo de MS (Cháidez-Ibarra *et al.*, 2021), codifica una abundante lipoproteína de superficie inmunodominante que escinde dos antígenos de membrana principales de MS, es decir, las lipoproteínas MSPA (parte C-terminal, proteína principal de superficie A) y MSPB (parte N-terminal, proteína principal de superficie B) y posibilita identificar al menos seis genotipos que circulan en China (Sui *et al.*, 2021) de la diversidad de los 14 grupos (A~N) tipificados sobre la base del tamaño de la región PRR (Bencina *et al.*, 2001). El gen *vlhA* (además de *pvpA*) tiene alto poder discriminatorio por la alta divergencia en la secuencia de nucleótidos entre cepas de MG (Ghorashi *et al.*, 2013).

3.2.1 Objetivo general. El presente estudio tuvo como objetivo evidenciar MG y MS por detección molecular en aves ligeras comerciales del noroeste de México.

3.2.2 Objetivos específicos. Los objetivos específicos del presente trabajo fueron: 1) probar la extracción de ADN por lisis térmica de cepas vacunales e hisopos traqueales de aves ponedoras comerciales 2) sintetizar oligonucleótidos específicos que amplifican secuencias conservadas de los genes ARNr 23S y 16S, *mgc2* y *vlhA* entre diferentes cepas de MG y MS, 3) verificar la amplificación de ADN de las cepas vacunales TS11 y MS-H por LAMP o PCR y 4) detectar MG y MS por LAMP o PCR en hisopos traqueales de aves ponedoras comerciales en Sinaloa y Sonora.

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 Colecta de muestras. Este estudio de campo es de naturaleza epidemiológica observacional descriptivo y fue sometido a revisión por un Comité Institucional de Bioética para el cuidado y uso de los animales experimentales, dado que la colecta de hisopos traqueales podría considerarse un procedimiento invasivo, pero no implicó sacrificio de aves, por lo que no transgrede la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

Para calcular el tamaño de la muestra (n), se tuvo en cuenta los estándares establecidos por la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), considerando prevalencia estimada ($p=0.38$), nivel de confianza deseado ($t=0.95$) y margen de error aceptable ($m=0.05$) para lograr un mínimo de 95% de sensibilidad y especificidad utilizando la fórmula: $n = t^2 \times p \times (1-p) / m^2$, reportada por Abbas *et al.* (2018) y también se consideró superar la mediana (64) del tamaño muestral de los estudios incluidos en el metaanálisis (MA) integrado con

85 publicaciones reportado por Chaidez-Ibarra *et al.* (2021). Por lo tanto, fueron colectadas entre mayo de 2019 hasta febrero de 2021 un total de 89 muestras individuales de hisopos estériles secos frotando la pared traqueal para extraer las células de la mucosa (14-15 hisopos/granja) de seis parvadas de aves comerciales para postura de diferentes edades (12-115 semanas) sospechosas de micoplasmosis aviar en los estados de Sinaloa y Sonora, México y los hisopos traqueales fueron almacenados secos en congelación hasta su procesamiento. Las cepas vacunales de MG (TS-11[®], *Boehringer-Ingelheim Animal Health*) y MS (Vaxsafe MS-H[®], Avimex) fueron utilizadas como control positivo y agua destilada como control negativo. La extracción de ADN se realizó con el método físico de lisis térmica (ebullición/frío) y la detección molecular con los ensayos de PCR o LAMP. Se probó la aplicabilidad del ensayo LAMP en condiciones de campo para estimar la ocurrencia de MG en Sinaloa y Sonora.

3.3.2 Extracción de ADN por lisis térmica. Para extracción de ADN se utilizó el método físico por lisis térmica a partir de hisopos de aves sospechosas de micoplasmosis o de cepas vacunales: los hisopos fueron sumergidos en 0.5-1.0 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS), la suspensión celular fue centrifugada a 13,000 rpm durante 30 min y se eliminó cerca del 85-90% del sobrenadante. El sedimento (pelet con la suspensión celular de ~80 μ L o sólo pelet) fue disuelto en un volumen de elusión de 25-50 μ L de agua desionizada estéril, se calentó a 95-100 °C en un baño de agua durante 10-30 min y después fue enfriado por más de 10 min en el congelador doméstico (-20 °C), se centrifugó el lisado a 13,000 rpm durante 5 min, se recogió el sobrenadante que contiene ADN en tubos Eppendorf de 0.2-1.5 mL y fue almacenado a -20 °C hasta su análisis molecular posterior para usar como molde en la reacción de amplificación (Elbehiry *et al.*, 2016; Ghaniei *et al.*, 2016; Kahya *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2001; Rasoulinezhad *et al.*, 2017; Rauf *et al.*, 2013; Uddin *et al.*, 2016; Ventura, Ramírez & Vera, 2012).

Las concentraciones de ADN de cepas vacunales de MG y MS y algunas muestras de campo se determinaron a partir de lecturas de la absorbancia (A) a una densidad óptica (DO) de 260 nm (A_{260}) y la pureza se midió mediante la relación $A_{260/280}$ y A_{260}/A_{230} usando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA) (Szczepanek *et al.*, 2010; Xiong *et al.*, 2019). Los ácidos nucleicos absorben luz a 260

nm a través de los residuos de adenina, mientras que la proteína absorbe la luz a 280 nm a través de los residuos aromáticos de triptófano y tirosina (Buckingham, 2019). La relación de A_{260}/A_{280} del ADN bicatenario natural debe estar cerca de 1.8–2.0 (Xiong *et al.*, 2019). Si la relación de A_{260}/A_{280} nm es inferior a 1.6, la preparación de ácido nucleico puede estar contaminada con cantidades inaceptables de proteína, mientras que en una proporción superior a 2.0 puede haber contaminación con ARN (Buckingham, 2019).

3.3.3 Ensayos moleculares para amplificación del ADN. Los oligonucleótidos fueron diseñados a partir de secuencias de los genes *mgc2* de MG y *vlhA* de MS para LAMP, ARNr 16S de MG y *vlhA* de MS para PCR y sintetizados en el Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). La elección de cada juego de oligonucleótidos se determinó con base en los reportes de literatura, para los genes *mgc2* (Ehtisham-ul-Haque *et al.*, 2017) y ARNr 16S de MG (Gharibi, Ghadimipour & Mayahi, 2018) y para el gen *vlhA* de MS (Kursa *et al.*, 2015; Kursa, Tomczyk & Sawicka, 2019), cuyas secuencias se detallan en el cuadro 6.

Se diseñó en línea usando el programa *Primer Explorer V5* (<http://primerexplorer.jp/e/>) (Eiken Chemical, Tokio, Japón) dos nuevos conjuntos de cuatro oligonucleótidos LAMP dirigidos a la secuencia de los genes ARNr 23S de MG y ARNr 16S de MS. Para diseñar los oligonucleótidos específicos externos (F3 y B3) e internos (FIP y BIP), fue necesario obtener la secuencia consenso de cepas de MG y MS, para lo cual se realizó alineación con Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) de secuencias de una región de 423 (MG) y 484 (MS) nucleótidos obtenidas de GenBank NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) de seis cepas de MG de referencia (R *high*, MG70, S6, TS11, F y 6/85, números de acceso CP001872.1, CP028147.1, CP006916.3, CP044225.1, CP001873.1 y CP044224.1, respectivamente) y cuatro cepas de MS (MS-H, ATCC 2504, MS53 y HN01, números de acceso CP021129.1, CP011096.1, AE017245.1 y CP034544.1, respectivamente). Los oligonucleótidos internos (FIP y BIP) se componen de dos secuencias separadas por un guión que corresponden a diferentes posiciones del ADN diana (FIP es F2-F1c y BIP es B1c-B2). Las secuencias 5' 3' se muestran a continuación:

para	MG	F3	(TTATGGTGGATGCCTTGG),	B3
		FIP	(TATCGCTTCCAACCAGCTCC-	
		BIP	(GTAGATGTCCGAATGGGGGAA-	
			CACTAGAAGGCGATGAAGG)	

CGTATTGCTTTTAGACCCTATG) y para MS F3 (AGAAAGGAGGTAATCCATCC), B3 (TCGTAGATCAGCTACGCTA), FIP (GAGACGACTGCCTAAGGCAG-CCACGTTCTCGTAGGGAT) y BIP (GAAGTTAACAAACCGACTTCGGG-TGAATACGTTCTCGGGTC).

Cuadro 6. Secuencia de oligonucleótidos dirigidos a los genes ARNr 16S y *mgc2* de MG y *vlhA* de MS para PCR y LAMP reportadas en la literatura.

Técnica	Gen	Oligonucleótido	Referencia	Secuencia
LAMP	<i>mgc2</i>	MG F3	(Ehtisham-ul-Haque <i>et al.</i> , 2017)	AAGCGATTGAGCCAACTG
LAMP	<i>mgc2</i>	MG FIP	(Ehtisham-ul-Haque <i>et al.</i> , 2017)	GATCCCTATCTGAGGGTTATTAGCT-CTGAAGAAGTTAATACTCAAGAACC
LAMP	<i>mgc2</i>	MG BIP	(Ehtisham-ul-Haque <i>et al.</i> , 2017)	ACCTCAGATTAATCCGCAATTTGGT-TTGGTTAGGTGGCATTGG
LAMP	<i>mgc2</i>	MG B3	(Ehtisham-ul-Haque <i>et al.</i> , 2017)	TAAACCCTGGTCGCATTC
LAMP	<i>vlhA</i>	MS F3	(Kursa <i>et al.</i> , 2015)	GGTGATCAAACCTCCAGCA
LAMP	<i>vlhA</i>	MS FIP	(Kursa <i>et al.</i> , 2015)	CTCCTGGGTTTCCTGGGTTTC-CCTGCTCCAACACCTGG
LAMP	<i>vlhA</i>	MS BIP	(Kursa <i>et al.</i> , 2015)	TTGACCCTGTAGAGGCTGCTA-GCATCTGCTGTTGTAGTTGT
LAMP	<i>vlhA</i>	MS B3	(Kursa <i>et al.</i> , 2015)	TAACCGATCCGCTTAATGC
LAMP	<i>vlhA</i>	MS Loop F	(Kursa <i>et al.</i> , 2015)	TGGGTTTCCTGGATTTGGG
LAMP	<i>vlhA</i>	MS Loop B	(Kursa <i>et al.</i> , 2015)	GCTATTGATGCTGCAACAGAAT
PCR	16S	MG F	(Gharibi <i>et al.</i> , 2018)	AGCTAATCTGTAAAGTTGGTC
PCR	16S	MG R	(Gharibi <i>et al.</i> , 2018)	GCTTCCTTGCGGTTAGCAAC
PCR	<i>vlhA</i>	MS F	(Kursa <i>et al.</i> , 2019)	GGCCATTGCTCCTRCTGTTAT
PCR	<i>vlhA</i>	MS R	(Kursa <i>et al.</i> , 2019)	AGTAACCGATCCGCTTAATGC

F3, oligonucleótido externo directo; B3, oligonucleótido externo inverso; FIP, oligonucleótido interno directo (F1c + F2); BIP, oligonucleótido interno inverso (B1c + B2); *LoopF*, oligonucleótido de bucle directo; *LoopB*, oligonucleótido de bucle inverso; F, oligonucleótido directo; R, oligonucleótido inverso.

La reacción con la mezcla de PCR de 12.5 µL consistió en 6.25 µL de 2x MyTaq mix (Bioline, UK), 1 µL de cada oligonucleótido F y R 10 µM (IBT, UNAM), 3.25 µL de agua y 2 µL de plantilla (ADN). El protocolo de amplificación fue desarrollado de la siguiente manera: pre-desnaturalización a 94 °C durante 3 min, seguida de 32 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, recocido a 63 °C durante 40 s y extensión a 72 °C durante 60 s, con una extensión final a 72 °C durante 5 min. Los amplicones (5 µL) obtenidos en PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1.3% teñido con

3 μL de Gel Red 3X en buffer TAE 1X a 60V durante 60 m, siendo posteriormente visualizados mediante cámara ultravioleta (Bio-Rad Laboratories). La longitud de los productos de PCR se comparó con el marcador de peso molecular DNA GeneRuler 100 pb Plus (Thermo-scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

Cuadro 7. Mezcla de trabajo de cada oligonucleótido de PCR para la solución madre 10 μM .

PCR Clave	Original C1, [pmol/ μL]	Solución 10X V1, μL	Final, (10 μM) C2, [pmol/ μL]	Mezcla final, μL V2, μL (oligonucleótido)	Agua μL
MG 16S F	163	12.3	10	200	187.7
MG 16S R	222	9.0	10	200	191.0
MS vIhA F	171	11.7	10	200	188.3
MS vIhA R	200	10.0	10	200	190.0

Para LAMP, se prepararon dos mezclas de reactivos (cuadro 8) conforme a Tanner & Evans (2014): para MS con todos los juegos de oligonucleótidos y para MG sin los oligonucleótidos bucle. Éstos oligonucleótidos se mezclaron en una solución de trabajo LAMP con el uso de la fórmula general de dilución $C_1V_1=C_2V_2$, para calcular la dilución de los oligonucleótidos en la mezcla de trabajo, considerando la concentración final en la reacción que usaron Ehtisham-ul-Haque *et al.* (2017) para *mgc2* y Kursu *et al.* (2015) para *vIhA*. El volumen total de la reacción LAMP inicial fue de 12.5 μL y las cantidades usadas fueron adaptadas de las concentraciones reportadas en la literatura o definidas por el fabricante de la enzima. El ensayo inicial incluyó 2.0 μL de agua destilada, 1 μL de la mezcla de oligonucleótidos LAMP (con cuatro oligonucleótidos: 40 μM de FIP y BIP y 5 μM de F3 y B3; con seis oligonucleótidos: 10 μM de FIP y BIP, 2.5 μM de F3 y B3 y 5 μM de LF y LB), 7.5 μL de Bst polimerasa y 2 μL del ADN blanco. Las mezclas de reacción se incubaron en el rango de temperatura de 63 a 67 $^{\circ}\text{C}$ hasta 120 min y finalmente se calentaron hasta 80 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 min para inactivar la enzima. Los resultados de la reacción LAMP se observaron a simple vista por cambio de color de las muestras positivas a amarillo o ámbar, mientras que las muestras negativas conservan el color rojo o rosado.

Para confirmar las reacciones de PCR y LAMP se utilizó como referencia un control positivo (cepas vacunales de MG y MS) y un control negativo (alícuotas de agua destilada estéril). Además, para evaluar la especificidad analítica de las pruebas PCR y LAMP, se usó ADN genómico de las cepas vacunales que no corresponden a las secuencias

especie específicas de los oligonucleótidos (MS-H con *mgc2* o ARNr 23S de MG y TS11 con *vlhA* o ARNr 16S de MS).

Una vez estandarizada la técnica LAMP con 6.5 µL de agua destilada, 1 µL de la mezcla de oligonucleótidos LAMP ARNr 16S, 4.0 µL de Bst polimerasa 2.0 y 1 µL del ADN blanco, se evaluó con 89 muestras de hisopos traqueales para detectar ADN de cepas de campo de MG de seis granjas avícolas para postura comercial de Sinaloa y Sonora, en el noroeste de México.

Algunos productos amplificados por PCR positivos a MG y MS obtenidos en el estudio fueron enviados a la Universidad de Guadalajara y se sometieron a secuenciación Sanger tanto en dirección directa como inversa utilizando el mismo conjunto de oligonucleótidos utilizado para la amplificación. Las secuencias sin procesar identificadas se editaron con Chromas, se alinearon con CLC Genomics Workbench o UGENE para obtener la secuencia consenso y se compararon entre sí y con la secuencia esperada de referencia de los amplicones de MG y MS, respectivamente por el algoritmo de la Herramienta de Búsqueda de Alineación Local Básica (BLAST, por sus siglas en inglés) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las alineaciones de secuencias se realizaron en <https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/> y se descargaron en formato Nexus. El documento fue abierto en el programa Mesquite versión 3.70, en el cual se limpiaron las matrices y luego se cambió a formato tipo PHYLIP. Para la elaboración del árbol filogenético se utilizó la página *web phylo* <https://www.phylo.org/portal2/data!list.action?id=636789>, en la cual se utilizó la herramienta RAXML-HPC2 sobre XSEDE y 1000 *bootstrap*. Al finalizar se descargó el archivo RAXML_bipartitions.result y se abrió con el programa *FigTree* v1.4.4 para ver y editar el árbol filogenético.

Cuadro 8. Preparación de las mezclas de oligonucleótidos LAMP con MG ARNr 23S y MS ARNr 16S.

LAMP Clave	Mezcla LAMP [$\mu\text{M}/\text{reacción}$]	Original C1, [$\text{pmol}/\mu\text{L}$]	Solución 25X V1, μL	Final C2, [$\text{pmol}/50 \mu\text{L}$]	Mezcla LAMP V2, μL (reacción)
MG 23S F3	5.0	287	0.9	250	1.0
MG 23S FIP	40.0	112	17.9	2,000	1.0
MG 23S BIP	40.0	91	22.0	2,000	1.0
MG 23S B3	5.0	287	0.9	250	1.0
Oligonucleótidos			41.6	50.0	1.0
Agua			8.4		
Solución 25 X			50.0		
MS 16S F3	5.0	288	0.9	250	1.0
MS 16S FIP	40.0	81	24.7	2,000	1.0
MS 16S BIP	40.0	96	20.8	2,000	1.0
MS 16S B3	5.0	236	1.1	250	1.0
Oligonucleótidos			47.5	50.0	1.0
Agua			2.5		
Solución 25 X			50.0		

3.3.4 Análisis estadístico. Los datos sobre concentración y calidad de ADN extraído por lisis térmica fueron analizados estadísticamente en el programa *Minitab* versión 15 con la prueba de ANOVA considerando significancia estadística cuando los valores de P resultaron <0.05 , mientras que los resultados de aves positivas a MG y MS fueron analizados con STATA versión 14. La proporción de ocurrencia de aves positivas a MG y MS de cada sitio de muestreo detectada por LAMP y PCR se resumió cuantitativamente mediante un metanálisis de proporciones para obtener una estimación combinada de los estudios individuales con un modelo de efectos aleatorios (D-L) (Nikolakopoulou, Mavridis & Salanti, 2014) utilizando la transformación de doble arcoseno de Freeman-Tukey para estabilizar la varianza (Barendregt *et al.*, 2013) con un intervalo de confianza exacto de 95% (Nyaga, Arbyn & Aerts, 2014). Utilizamos metanálisis de subgrupos para agregar los estudios de cada sitio de muestreo a nivel de especie de *Mycoplasma*. Usamos una prueba de significancia para el efecto general con la estadística z (tamaño del efecto = 0) (Diaz *et al.*, 2021) y evaluamos la heterogeneidad significativa entre los ensayos con la estadística Q de Cochran (prueba χ^2). Finalmente, utilizamos la estadística I^2 para determinar la proporción de variación en los efectos debido a

variaciones por los efectos verdaderos en lugar de error de muestreo (Borenstein *et al.*, 2017). El comando `metaprop` se puede instalar directamente dentro de Stata escribiendo `ssc install metaprop` cuando uno está conectado a Internet. Generamos mediante el procedimiento Stata `metaprop` la salida que muestra el diagrama de bosque con la instrucción: `metaprop num denom, random cimethod(exact) ftt label(namevar=sitio, yearvar=edad) boxsca(330) astext(70) texts(115) table xsize(20.0) ysize(15.5) xlab(0, 25, 50, 75, 100) xtick(12.5, 37.5, 62.5, 87.5) force xtitle(Proporción, size(2.8)) olineopt(lcol(red) lwidth(thick) lpattern(shortdash)) diamopt(lcolor(blue) lwidth(thick)) graphregion(color(white)) plotregion(color(white)) power(2.0) xline(1, lcolor(black)) pointopt(msymbol(x)mssize(1)) boxopt(msymbol(triangle) lpattern(dot) mcolor(orange)) by(mycoplasma) sortby(_ES) lcols (sitio estudio edad) nowt stats overall t1 (Detección molecular (LAMP y PCR) de MG y MS en el Noroeste de México) b2 (Estimación agrupada e intervalo de confianza de la ocurrencia de MG y MS).`

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

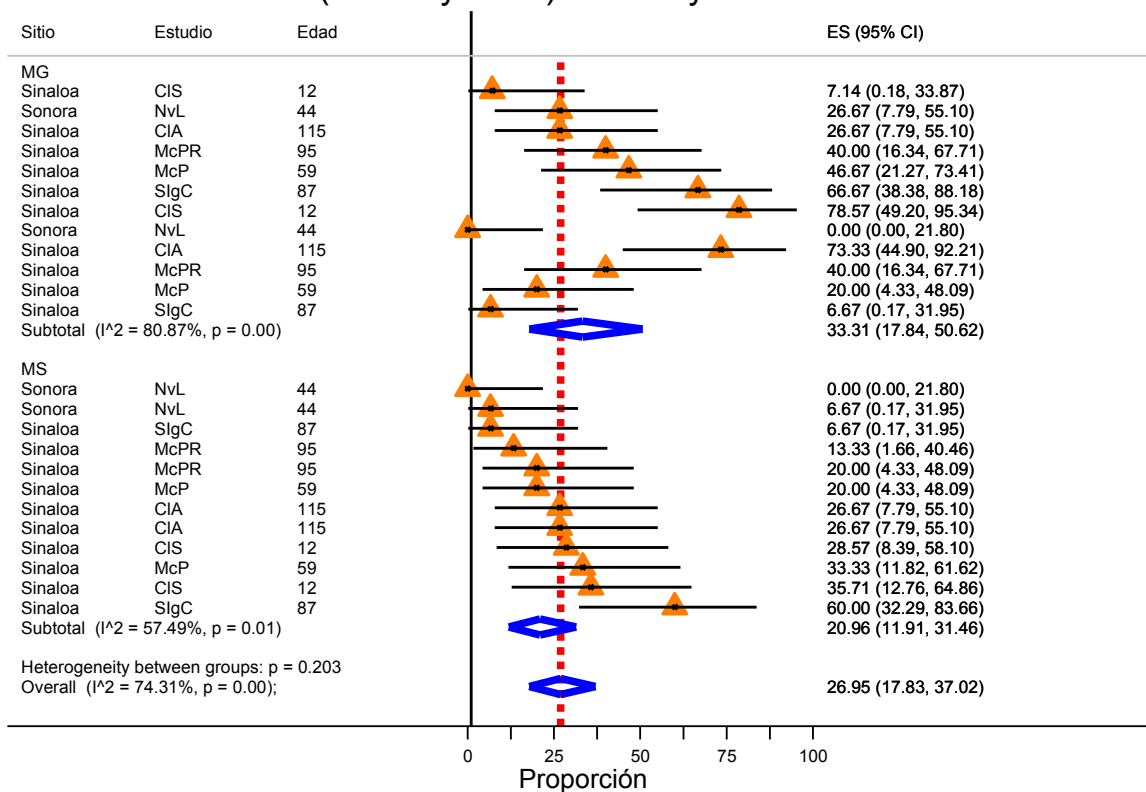
3.4.1 Resumen e implicaciones de los hallazgos.

La estimación agrupada de ocurrencia a partir de 89 muestras de aves ponedoras comerciales en seis sitios de muestreo para MG detectada por LAMP fue de 34.59% (IC del 95%, 18.64-52.30) y por PCR de 32.14% (6.95-63.82), resultando una estimación conjunta de 33.31% (17.84-50.62); mientras que para MS por LAMP fue de 19.16% (10.37-29.52) y por PCR de 22.79% (7.11-43.00), cuya estimación conjunta fue de 20.96% (11.91-31.46) y coinfección en ocho muestras 8.99% (3.96-16.95%) por LAMP y en siete muestras 7.87% (3.22-15.54) por PCR. Existió una marcada discrepancia entre LAMP y PCR en MG para los sitios de muestreo SIgC y CIS y en MS para el sitio SIgC del centro de Sinaloa. Se identificó al menos un ave positiva a MG o MS en cada sitio de muestreo, con coinfección en cuatro sitios de muestreo y se confirmó la presencia de MG y MS por LAMP y PCR en los seis sitios de muestreo de Sinaloa y Sonora.

Las pruebas de significancia y los intervalos de confianza (IC) no brindan por sí mismas una base lógica sólida para concluir que un efecto está presente o ausente con certeza o con una probabilidad determinada. Por lo tanto, a pesar de la popularidad de los valores de *P* y los intervalos de confianza, no existe un método estadístico que sea inmune a la

mala interpretación y el mal uso (Greenland *et al.*, 2016), razón por la cual el presente artículo trata con prudencia las estadísticas y solo destaca las estimaciones conjuntas de las proporciones (media e IC) de los datos encontrados, que son relevantes en la investigación primaria para reducir la ambigüedad existente en cuanto a la ocurrencia de MG y MS en el Noroeste de México, en lugar de mostrar diferencias de ocurrencia entre ambos patógenos, ya que hubo superposición entre los intervalos de confianza de cada patógeno con la estimación agrupada conjunta (heterogeneidad no significativa entre los subgrupos MG y MS, $P=0.203$) y un tamaño del efecto significativo ($z=8.45$, $P=0.00$) entre los ensayos, con heterogeneidad significativa según la estadística χ^2 (89.54, $gl=23$; $P=0.00$) y una proporción moderada de variación atribuible a la heterogeneidad según el valor de I^2 del 74.31% ($P=0.00$), que se presenta en la figura 5. La presencia de MG y MS se confirmó mediante la amplificación de los genes ARNr 23S y 16S con LAMP o PCR en los seis sitios de muestreo en Sinaloa y Sonora, por lo que hubo al menos un ave positiva para MG o MS en cada sitio de muestreo, con coinfección en cuatro sitios de muestreo. La ocurrencia combinada de MG (33.31%) identificada en conjunto por LAMP y PCR en este estudio de campo es consistente con los resultados obtenidos para gallinas ponedoras (31.9%) por Chaidez *et al.* (2021) en su MA y está muy cerca del 39.31% de la prevalencia mundial general agrupada de los estudios de Ramasamy *et al.* (2021). Por otro lado, la ocurrencia agrupada de MS (20.96%) detectada conjuntamente por LAMP y PCR en el presente estudio difiere de Petrone-Garcia *et al.* (2020) quienes reportan que MS es el micoplasma aislado con mayor frecuencia en la producción avícola mexicana y también difiere en cierta medida con la ocurrencia mundial agrupada de MS en gallinas ponedoras (38.4%) del MA reportado por Chaidez *et al.* (2021) y con la prevalencia agrupada general del 42.52% informada por Ramasamy *et al.* (2021). Como factores de riesgo en ésta región que predisponen a la transmisión horizontal de MG y MS entre aves, es importante señalar las parvadas de múltiples edades, alta concentración avícola en áreas aledañas y zona costera de escasas montañas donde los vientos pueden arrastrar polvo distancias considerables, además de la dificultad para cumplir con las medidas de bioseguridad.

Detección molecular (LAMP y PCR) de MG y MS en el Noroeste de México



Estimación agrupada e intervalo de confianza de la ocurrencia de MG y MS

Figura 5. Estimación agrupada de la ocurrencia de MG y MS a través de detección molecular por LAMP y PCR en seis granjas de aves ponedoras de Sinaloa y Sonora.

3.4.1.1 Extracción de ADN por lisis térmica, concentración y calidad del ADN. El procedimiento físico de extracción de ADN resultante de la ebullición a partir de restos celulares fue útil y confiable para amplificar el ADN sin necesidad de purificación. Se validó el proceso de extracción de ADN por el método rápido y simple de lisis basado en ebullición con las cepas vacunales TS11 y MS-H, logrando la concentración más alta de ADN con 27.5 min (60.3 ± 8.84 ng/ μ L) comparado con 12.5 min (32.6 ± 10.27 ng/ μ L) con diferencia significativa ($P=0.000$, $R^2=74.59\%$), pero sin diferencia significativa ($P=0.096$, $R^2=17.40\%$) para calidad de ADN (A_{260}/A_{280} 1.32 ± 0.1921 y 1.17 ± 0.1363 , respectivamente para 27.5 min y 12.5 min).

Se logró mejor calidad de ADN con sedimento de muestras de campo hervidas 30 min con el pelet junto con la suspensión celular de ~ 80 μ L y 50 μ L de agua desionizada estéril (A_{260}/A_{280} 1.77 ± 0.1725) comparado con sólo pelet y 50 μ L de agua desionizada estéril

(A_{260}/A_{280} 1.59 ± 0.3856), con diferencia significativa ($P=0.003$, $R^2=8.02\%$), pero sin diferencia significativa ($P=0.699$, $R^2=0.14\%$) para concentración de ADN (46.73 ± 18.38 ng/ μ L y 45.14 ± 14.09 para pelet junto con restos celulares y sólo pelet, respectivamente). Xiong *et al.* (2019) extrajeron con éxito el ADN total de todas las muestras para validar el método con calor y aunque con calor la integridad del ADN es menor y hay presencia de inhibidores potenciales, todas las muestras se amplifican con éxito en PCR convencional y PCR en tiempo real.

La menor concentración de ADN de las muestras hervidas por 12.5 min puede explicarse por una lisis incompleta en el método rápido de lisis térmica, que resulta en una liberación incompleta del ADN intracelular (Saull *et al.*, 2016). El ensayo de ebullición a 90 °C por 5 min parece romper la pared celular de manera menos eficiente, porque el ADN diana permanece en la célula (Silva *et al.*, 2012). Hirano *et al.* (1997) demostraron que el rendimiento de productos amplificados de PCR utilizando ADN obtenido de sobrenadante después de 10 min de ebullición fue sorprendentemente bajo (sin embargo, fue alto con ADN obtenido de restos celulares sedimentados) y el rendimiento fue mayor solo cuando las células se hirvieron durante al menos 20 min. La ebullición prolongada (20 min a 100 °C) es un método adecuado de preparación de muestras de células para su posterior detección mediante PCR (Lou *et al.*, 1993). Demirbilek, Ardicli & Carli (2020) detectaron MG y Kahya *et al.* (2015) MG y MS en aves reproductoras con PCR en tiempo real en diferentes muestras clínicas a partir del sobrenadante recuperado después de sedimentar el pelet resuspendido en 25 μ L de agua desionizada estéril que se hirvió a 95-100 °C durante 30 min. La concentración de ADN aumenta al resuspender el sedimento precipitado por centrifugación en un pequeño volumen de agua (50 a 250 μ L), sobre todo cuando el rendimiento es bajo como es el caso de algunas muestras clínicas (Buckingham, 2019).

Se pueden usar medidas espectrofotométricas para estimar la pureza del ácido nucleico. Los ácidos nucleicos absorben luz a 260 nm a través de los residuos de adenina, mientras que la proteína absorbe la luz a 280 nm a través de los residuos aromáticos de triptófano y tirosina (Buckingham, 2019). La relación de A_{260}/A_{280} del ADN bicatenario natural debe estar cerca de 1.8–2.0 (Xiong *et al.*, 2019). Debido a su abundancia y estrecha asociación con el ácido nucleico en la célula, el contaminante más probable en

una preparación de ácido nucleico será la proteína. Si la relación de 260 nm/280 nm es inferior a 1.6, la preparación de ácido nucleico puede estar contaminada con cantidades inaceptables de proteína, mientras que en una proporción superior a 2.0 puede haber contaminación con ARN (Buckingham, 2019).

La extracción de ADN mediante un método de ebullición, que es rápido, sencillo y económico (Dashti *et al.*, 2009), se ha reportado para la detección de micoplasmosis aviar en al menos 18 publicaciones calentando la muestra 10 min (Agüero, Chávez, & Martínez, 2004; Buim *et al.*, 2009; Elbehiry, Al-Dubaib, & Eman, 2016; Fan, Kleven, & Jackwood, 1995; Ghaniei, 2016; Gharibi, Ghadimipour, & Mayahi, 2018; Hernández *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2001; Mettifogo *et al.*, 2015; Muhammad *et al.*, 2018; Pakpinyo, Khanda, & Lekdamrongsak, 2007; Pakpinyo, Khanda, & Boonyapisitsopa, 2009; Pohuang, Phuektes, & Junnu, 2020; Rasoulinezhad *et al.*, 2017; Rasoulinezhad *et al.*, 2018; Rauf *et al.*, 2013; Uddin *et al.*, 2016; Ventura, Ramírez, & Vera, 2012) y al menos en dos publicaciones con ebullición de 30 min (Demirbilek, Ardicli & Carli, 2020; Kahya *et al.*, 2015).

Además, el protocolo de ebullición se ha aplicado con éxito con otro tipo de muestras no dirigidas a *Mycoplasma* calentando durante 5 min (Silva *et al.*, 2012), 10 min (Dashti *et al.*, 2009; Deak, Chen, & Beuchat, 2000; Freschi, Carvalho, & Oliveira, 2005; Merk *et al.*, 2006; Rivoarilala *et al.*, 2021; Xiong *et al.*, 2019) o 15-20 min (Araújo, Angellis, & Azevedo, 2004; Gandasegui *et al.*, 2015; Lou *et al.*, 1993; Hirano *et al.*, 1997). Un ensayo similar al presente trabajo fue denominado método rápido LAMPellet de calor utilizado por Gandasegui *et al.* (2015) y fue el más eficiente para obtener ADN de buena calidad para la detección de *Schistosoma haematobium* en muestras de orina al calentar el sedimento obtenido después de la centrifugación a 95 °C durante 15-20 min, con 2 µL del sobrenadante usado inmediatamente como plantilla para cada reacción LAMP.

3.4.1.2 Ensayos moleculares para amplificación por LAMP y PCR del ADN extraído por lisis térmica. Se amplificó con éxito el ADN extraído por ebullición/enfriamiento de cepas vacunales y de muestras de campo con los oligonucleótidos LAMP ARNr 23S de MG (F3 5' TTATGGTGGATGCCTTGG3'; B3 5' GCTACTGAGATGTTTCACTTC3') y ARNr 16S de MS (F3 5'AGAAAGGAGGTAATCCATCC3'; B3 5'TCGTAGATCAGCTACGCTA3'). La amplificación del gen ARNr 16S genera una banda

en el gel de agarosa con un producto de amplicón de 183 pb de tamaño (García *et al.*, 2005; Rauf *et al.*, 2013).

También se logró amplificación (aunque no consistente) por PCR convencional del ADN de la cepa vacunal TS11 con los oligonucleótidos dirigidos al gen PCR ARNr 16S (F 5'AGCTAATCTGTAAAGTTGGTC3'; R 3'GCTTCCTTGCGGTTAGCAAC5'), así como de la cepa vacunal MS-H con oligonucleótidos dirigidos al gen PCR *vlhA* (F 5'GGCCATTGCTCCTRCTGTTAT3'; 3'AGTAACCGATCCGCTTAATGC5'). Sin embargo, no existió amplificación con los oligonucleótidos LAMP F3 y B3 para *mgc2* ni F3 y B3 para *vlhA* (Figura 6).

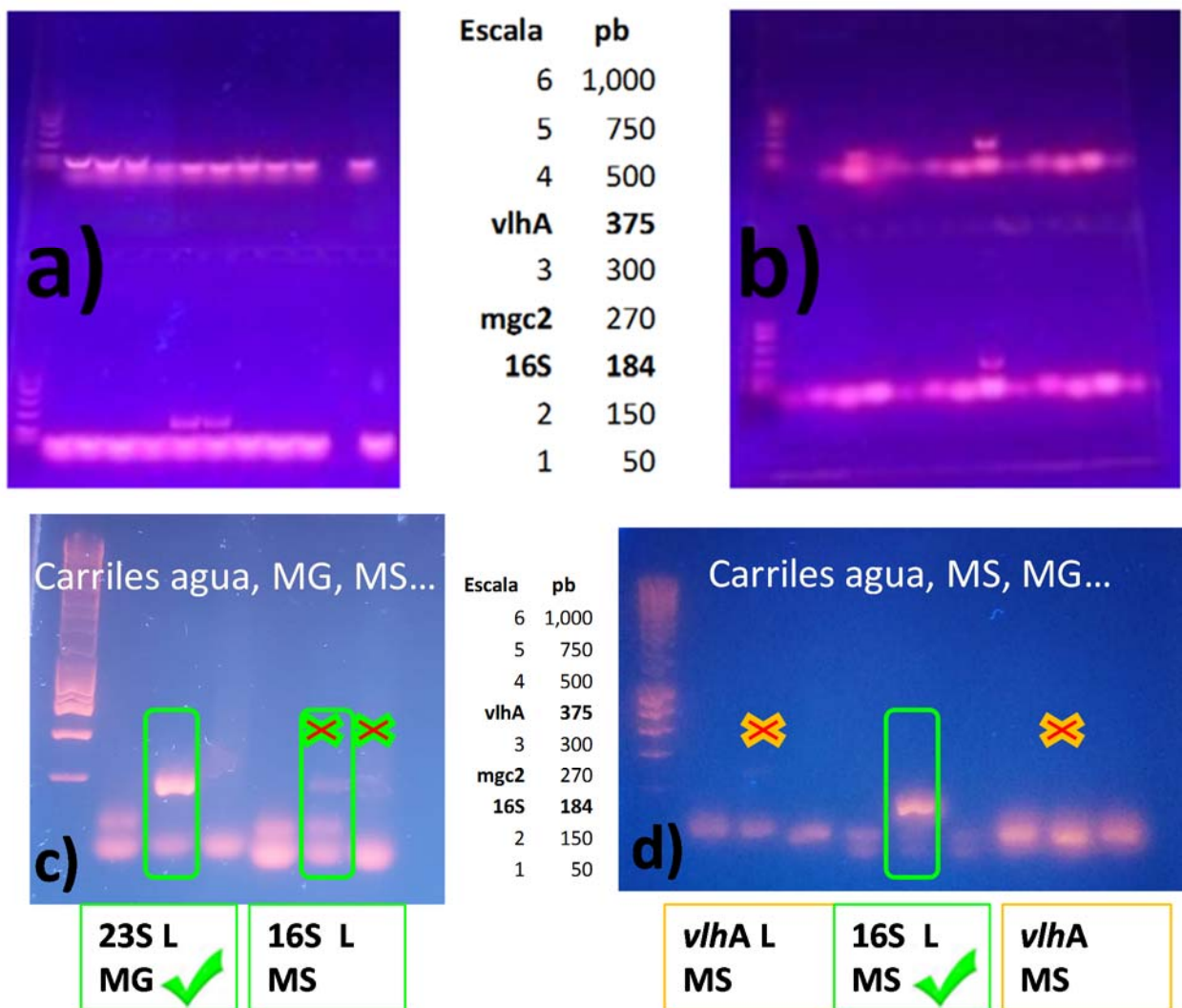


Figura 6. a) Amplificación sin éxito con oligonucleótidos PCR 16S y *vlhA* de PCR convencional con 35 ciclos, b) Amplificación exitosa con oligonucleótidos PCR 16S y *vlhA* con 32 ciclos. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 4, arriba cepa vacunal TS11; carril 9, arriba cepa vacunal MS-H y abajo muestra

clínica de granja. c) Amplificación con 32 ciclos carril positivo LAMP ARNr 23S MG con cepa vacunal TS11, carril falso positivo LAMP 16S MS con TS11 y falso negativo LAMP 16S MS con MS-H; d) Amplificación con 32 ciclos carril positivo LAMP 16S MS con cepa vacunal MS-H y falsos negativos PCR y LAMP *vlhA* con MS-H.

En la prueba inicial LAMP (23 jun 21) para la detección de cepas vacunales de MG y MS, se usó *WarmStart colorimetric LAMP 2X Master Mix M1800S* (Bst 2.0) en seis mezclas de reacción (dos controles negativos con agua, dos controles positivos con ADN y dos controles negativos con ADN distinto a la secuencia del oligonucleótido) para verificar especificidad y no se logró detectar amplificación de las cepas vacunales. En éste ensayo LAMP se incubaron a 63 °C las muestras durante una hora (h) en la mezcla de reacción y sólo cambió a amarillo el control negativo 1 (oligonucleótidos para MS + Bst 2.0 + agua). Se continuó la incubación 30 min más a 65 °C y cambió a amarillo el control negativo 4 (oligonucleótidos para MG + Bst 2.0 + agua), mientras que hubo ligero cambio a naranja del control negativo 5 (oligonucleótidos para MG + Bst 2.0 + ADN de MS). Por último, las muestras se incubaron a 65 °C otros 30 min, pero ya no hubo cambio de coloración adicional de ninguna de las muestras. Es decir, como se aprecia en la figura 7, de las muestras control, la cepa vacunal MS fue negativa para los oligonucleótidos *mgc2* (ligero cambio de rojo a naranja) y *vlhA* (no existió cambio de color). El control negativo (agua con oligonucleótido MS) viró de color rojo a amarillo después de incubar 60 min a 63 °C. La cepa vacunal MG fue negativa para los oligonucleótidos *mgc2* y *vlhA* (no existió cambio de color). El control negativo (agua con oligonucleótido MG) viró de color rojo a amarillo después de incubar 90 min a 63-65 °C.



Figura 7. Resultados de la prueba inicial de amplificación LAMP con cepas vacunales de MG y MS. a) Referencia *NewEngland BioLabs*, b) Amplificación LAMP con cepas vacunales de MG y MS. Izquierda

controles negativos con agua, centro controles positivos y derecha controles negativos con ADN distinto a la secuencia de oligonucleótidos.

Las reacciones con ADN polimerasa y rojo fenol muestran cambios de color (rosa a amarillo) en incubación a 65 °C, con una señal de amplificación clara y robusta visible a simple vista para muestras que contienen cantidades tan pequeñas como 2-3 copias del ADN diana en menos de 30 min y menos de 15 min para cantidades de plantilla superiores a 10 copias (Tanner, Zhang & Evans Jr, 2015). El umbral de sensibilidad para lograr una reacción positiva con oligonucleótidos poco eficientes, condiciones subóptimas o muestras impuras es hasta de 45 a 60 min. Normalmente, la fluorescencia proporcionará tiempos de umbral de 30% a 50% más rápidos que la turbidez debido a la naturaleza de la reacción, con umbrales de turbidez que oscilan entre 10 y 90 min (Tanner & Evans Jr, 2014).

3.4.1.2.1 Amplificación inespecífica o falsos positivos. Un problema común con las reacciones LAMP es la aparición de amplificación inespecífica (AI) o amplificación sin plantilla (ASP) (Scott *et al.*, 2020). Durante la amplificación, se producen algunas moléculas artificiales, además de las copias de secuencias originales que se duplican después de cada ciclo de replicación. El sesgo ocurre a una velocidad mayor durante los últimos ciclos de la reacción y por lo tanto, puede evitarse deteniendo la reacción antes (Kanagawa, 2003), pues la formación de tales moléculas aumenta al incrementarse el número de ciclos de reacción y las múltiples bandas (amplificaciones falsas) se eliminan simplemente reduciendo el número de ciclos de PCR (Bovo, Rugge & Shiao, 1999), dado que la cantidad del sesgo depende del número de ciclos, se puede reducir manteniendo bajo el número de ciclos (Suzuki & Giovannoni, 1996).

3.4.1.3 Estrategias para superar los desafíos de amplificaciones falsas o falta de amplificación. La amplificación de LAMP cambia el pH alcalino inicial a un pH ácido final por la liberación de los subproductos (resto pirofosfato e ion hidrógeno) en el proceso de incorporación de un desoxinucleósido trifosfato, produciendo una caída de 2-3 unidades de pH (de aproximadamente 8.8 pH inicial a un valor final de pH 6-6.5) sin pérdida de eficiencia de reacción en soluciones tamponadas muy débiles, debido al amplio rango de tolerancia al pH de las ADN polimerasas LAMP (ADN polimerasa Bst Fragmento grande y ADN polimerasa Bst 2.0) que realizan una síntesis eficiente dentro de un rango de pH 6.0-10.0. La cantidad de síntesis de ADN y la liberación de protones determina la

magnitud de la caída del pH en las reacciones de amplificación débilmente amortiguadas (Tanner, Zhang & Evans Jr, 2015).

El rojo de fenol (RF) provisto en un producto comercial cambia bruscamente del rosa al amarillo como resultado de una caída de pH en una reacción positiva. Sin embargo, puede presentar ligeros cambios en el tono de rosa de una manera dependiente de la temperatura. Al calentarse a temperatura ambiente o de incubación, una reacción negativa pierde su rosa brillante y aparece naranja en su lugar, presumiblemente debido a la dependencia de la temperatura del amortiguador de pH Tris y se puede minimizar éste fenómeno al mantener las muestras en hielo para preservar el contraste de color. El cambio de color depende del cambio de pH y ciertos fluidos corporales (sudor, orina, esputo), así como muestras ambientales (arcilla) pueden inducir cambios de color en ausencia de amplificación del ADN, por lo que el contenido del tampón de lisis y el pH de la muestra deben considerarse cuidadosamente cuando se usa LAMP como una herramienta de diagnóstico o aplicaciones en el campo, especialmente con indicadores sensibles al pH. Es fundamental documentar el cambio de color inmediatamente después de la terminación de la reacción para proporcionar resultados precisos (Scott *et al.*, 2020). Las amplificaciones falsas se pueden minimizar mediante el diseño de oligonucleótidos y la optimización del ensayo (Tanner & Evans Jr, 2014).

Para prevenir que los controles negativos den la señal positiva antes que los controles positivos y detectar las muestras positivas diana deseadas sin las amplificaciones falsas, se intentó optimizar el tiempo de incubación considerando las sugerencias de Tanner & Evans Jr (2014) que se mencionan a continuación para mejorar la especificidad (menor amplificación de falsos positivos sin plantilla). Se deben usar tiempos típicamente de 45 a 60 min para métodos como turbidez visual o cambio de color, se puede aumentar la temperatura (a 70 °C para Bst 2.0), el sulfato de magnesio se puede analizar en concentraciones más bajas que 8 mM (hasta 2 mM) y también la concentración de enzima (tan solo 0.02 U/μL de Bst proporciona amplificación; Bst polimerasa 2.0 incluye una concentración de 8U/μL). Estos factores son más efectivos con reacciones de alto número de copias y si se requiere una detección de alta sensibilidad (<100 copias) y la amplificación sin plantilla es alta, el rediseño del oligonucleótido es probablemente la estrategia más efectiva (Tanner & Evans Jr, 2014).

En el segundo ensayo (14 nov 21) se modificaron las condiciones de extracción de ADN para mejorar la concentración de ADN y la pureza (ebullición a 30 y 20 min con bajo volumen de sedimento 50-80 μL) y de reacción LAMP y menor volumen de *WarmStart colorimetric* LAMP 2X (6.5-4 μL), dado que contiene Tris con pH 8.8. También se modificó la concentración de oligonucleótidos para MS igualando la concentración utilizada por Kursá *et al.* (2015) con volumen de reacción de 12.5 μL , logrando prevenir la amplificación falsa del primer ensayo con las recomendaciones de Tanner & Evans Jr. (2014) de aumentar la temperatura (se incrementó a 65 °C), reducir la concentración de Bst 2.0 y MgSO_4 (a 4.0 μL para Bst 2.0), reducir el tiempo de amplificación (45 min). Aún así no se logró amplificación del control positivo (cepa vacunal de MS-H), pero permitió identificar que la falla del primer ensayo LAMP fue un problema de amplificación (síntesis de los oligonucleótidos sin el espaciador TTTT en los fragmentos FIP y BIP), por lo que se rediseñaron nuevos oligonucleótidos con el gen ARNr 23S para MG en primera instancia y posteriormente con ARNr 16S para MS.

Se utilizó el nuevo conjunto de oligonucleótidos dirigidos a los genes ARNr 23S de MG y ARNr 16S de MS, cuyos productos tienen una longitud de 192 y 193 nucleótidos, respectivamente. En el diseño de los oligonucleótidos se incluyeron espaciadores de TTTT, representados por el guión en las secuencias entre F1c y F2 de FIP y entre B1c y B2 de BIP (Notomi *et al.*, 2000), los cuales se omitieron en la primera síntesis de oligonucleótidos LAMP de *mgc2* y *vlhA*.

En el tercer intento LAMP con los nuevos oligonucleótidos MG ARNr 23S (15 ene 2022), se logró identificar la cepa vacunal TS11 de MG por el cambio de color rojo a ámbar sin amplificación de la cepa vacunal MS-H después de 55 min de reacción a 63-67 °C con 6.5 μL de agua desionizada, 1 μL de mezcla de oligonucleótidos ARNr 23S MG para una concentración de 40 μM de oligonucleótidos internos (FIP y BIP) y 5 μM de oligonucleótidos externos (F3 y B3), 4 μL de mezcla maestra Bst 2.0 y 1 μL de plantilla de ADN. La reacción se continuó hasta identificar amplificación sin plantilla en el control negativo con agua que ocurrió cerca de 120 min.

A partir del cuarto ensayo LAMP con los nuevos oligonucleótidos ARNr 23S se inició la detección de MG y posteriormente MS con oligonucleótidos ARNr 16S en muestras de campo, logrando detectar MG en 32 muestras y MS en 18 muestras de las 89 analizadas

después de 64 min de incubación a 64-67 °C (incubación máxima de 120 min) con 6.5 µL de agua desionizada, 1 µL de mezcla de oligonucleótidos ARNr 23S o 16S para una concentración de 40 µM de oligonucleótidos internos (FIP y BIP) y 5 µM de oligonucleótidos externos (F3 y B3), 4 µL de mezcla maestra Bst 2.0 y 1 µL de plantilla de ADN extraída a 20-30 min por lisis térmica.

No hubo consistencia con la amplificación del ADN de las cepas vacunales TS11 y MS-H por PCR para fines de validación con los oligonucleótidos PCR ARNr 16S o *vlhA*, ni con los oligonucleótidos LAMP *mgc2* o *vlhA*. Además, hubo escasa detección por LAMP y PCR de MG y MS en muestras extraídas por lisis térmica a 30 min (NvL) en un bloque con muy poco volumen de agua que se evaporó en una proporción importante, por lo que será importante evaluar en futuros estudios si éstas condiciones perjudican la integridad del ADN y se recomienda probar con tiempos de lisis de 15-20 min y suficiente volumen de agua (1.5-2 L) para solventar la evaporación.



Figura 8. Amplificación LAMP exitosa con ARNr 23S en muestras de campo de Sinaloa y Sonora. a) Extremo izquierdo controles negativos con agua, tubos superiores e inferiores con muestras positivas a MG y extremo derecho controles positivos con ADN de cepa vacunal TS11; b) ejemplo de viraje de color a amarillo con muestras positivas a MS en tubos del inferior y muestras negativas color rosa en parte superior.

3.4.1.4 Secuenciación de productos amplificados. Los amplicones de mejor calidad (bandas homogéneas bien definidas sin estructuras adyacentes en el gel de agarosa posterior a electroforesis con 1 µL de amplicón) se sometieron a secuenciación Sanger en el Hospital veterinario de pequeñas especies de la Universidad de Guadalajara. Alineamos y comparamos cada lectura sin procesar de los amplicones en ambas direcciones hacia adelante y hacia atrás entre sí y con la secuencia de referencia esperada para identificar las diferencias (falta de coincidencia) debido a nucleótidos incorrectos, ambiguos o indefinidos y se reemplazaron por los nucleótidos verdaderos en

cada secuencia individual para corregir la tasa de error y obtener una secuencia consenso más precisa. La secuencia consenso se obtuvo con amplicones de las muestras S7, S8 y 9P1, con una identidad del 89.24% y una cobertura de longitud de secuencia del 90% con respecto a la secuencia de referencia esperada de MG. Sin embargo, la secuencia consenso del amplicón de la muestra S3 fue más similar a *Gallibacterium anatis* (GA) con una identidad del 98.3-100% y una cobertura del 100%, mientras que solo mostró una identidad del 77.08% con la secuencia de referencia esperada de MG. La secuencia consenso del amplicón de MS de la muestra S10 dió como resultado una cobertura del 100% y una identidad de secuencia del 97.37% con respecto a la secuencia de referencia esperada de MS. Las secuencias de ARNr 23S y 16S se enviaron a la base de datos GenBank donde se obtuvieron los números de acceso; MS_16S192Nt (OP875054 sec 1), MG_23S174Nt (OQ319939 sec 2), and GA_23S176Nt (OQ319940 sec 3).

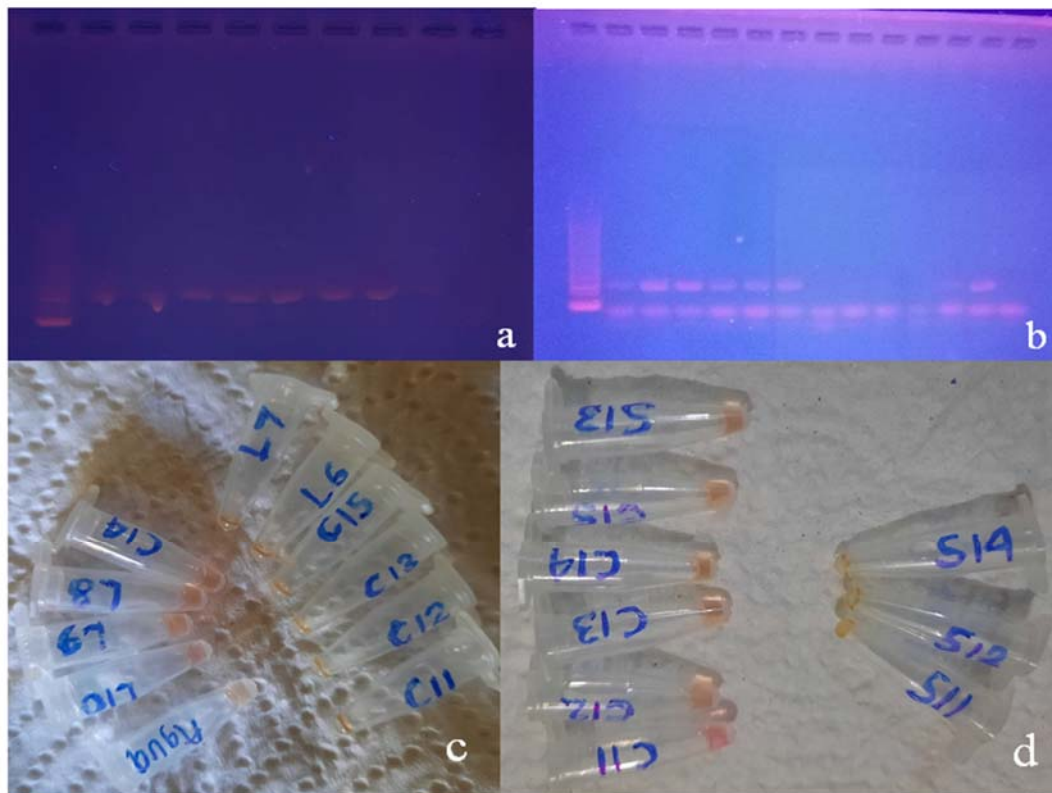


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa que muestra fragmentos de amplificación de los genes ARNr 16S y 23S. El carril 1 muestra una escalera de 100-1000 pb y los otros carriles corresponden a muestras de campo MG- (a) y MS-positivas (b), donde las bandas más intensas se consideraron candidatas para la

secuenciación. Ejemplos de contraste de color LAMP en muestras de campo MG (c) y MS (d), con color rosa (negativo) y amarillo o ámbar (positivo).

Las secuencias de nucleótidos obtenidas pertenecen a MG, MS y GA, como se puede observar en la figura 10. Las secuencias de referencia esperadas de MG ARNr 23S y MS ARNr 16S están 100% conservadas entre los genomas completos publicados en GenBank de 22 cepas de MG (accesos AE015450.2, CP001872.1, CP001873.1, CP003506.1, CP003507.1, CP003508.1, CP003509.1, CP003510.1, CP003511.1, CP003512.1, CP003513.1, CP006916.3, CP028146.1, CP028147.1, CP044224.1, CP044225.1, CP044226.1, CP070622.1, CP092249.1, CP092250.1, CP092251.1 y LS991952.1) y 21 cepas de MS (AE017245.1, CP011096.1, CP012624.1, CP021129.1, CP029258.1, CP034544.1, CP069379.1, CP079705.1, CP082192.1, CP082193.1, CP082194.1, CP082195. 1, CP082196.1, CP083748.1, CP103980.1, CP103981.1, CP103982.1, CP107525.1, CP107526.1, KP704286.1 y LS991953.1), respectivamente, lo cual sugiere que la identidad incompleta o la coincidencia insuficiente entre la secuencia consenso para los amplicones MG ARNr 23S o MS ARNr 16S y las secuencias de referencia esperadas se debe a las fuentes de error que puede tener la secuenciación de Sanger, incluido el efecto de las condiciones de PCR en el paso de amplificación y los errores de secuenciación (nucleótidos ambiguos, indefinidos o incorrectos). La información generada por los métodos de secuenciación todavía está sesgada debido a errores sistemáticos y aleatorios (Elloumia *et al.*, 2022). Los errores de secuenciación ocurren en alrededor del 0.1% al 1% de cada secuencia analizada; son más frecuentes en lecturas con caracteres de baja resolución, cuando la tecnología de secuenciación malinterpreta las señales o integra el nucleótido incorrecto (Scholz, Lo & Chain, 2012).

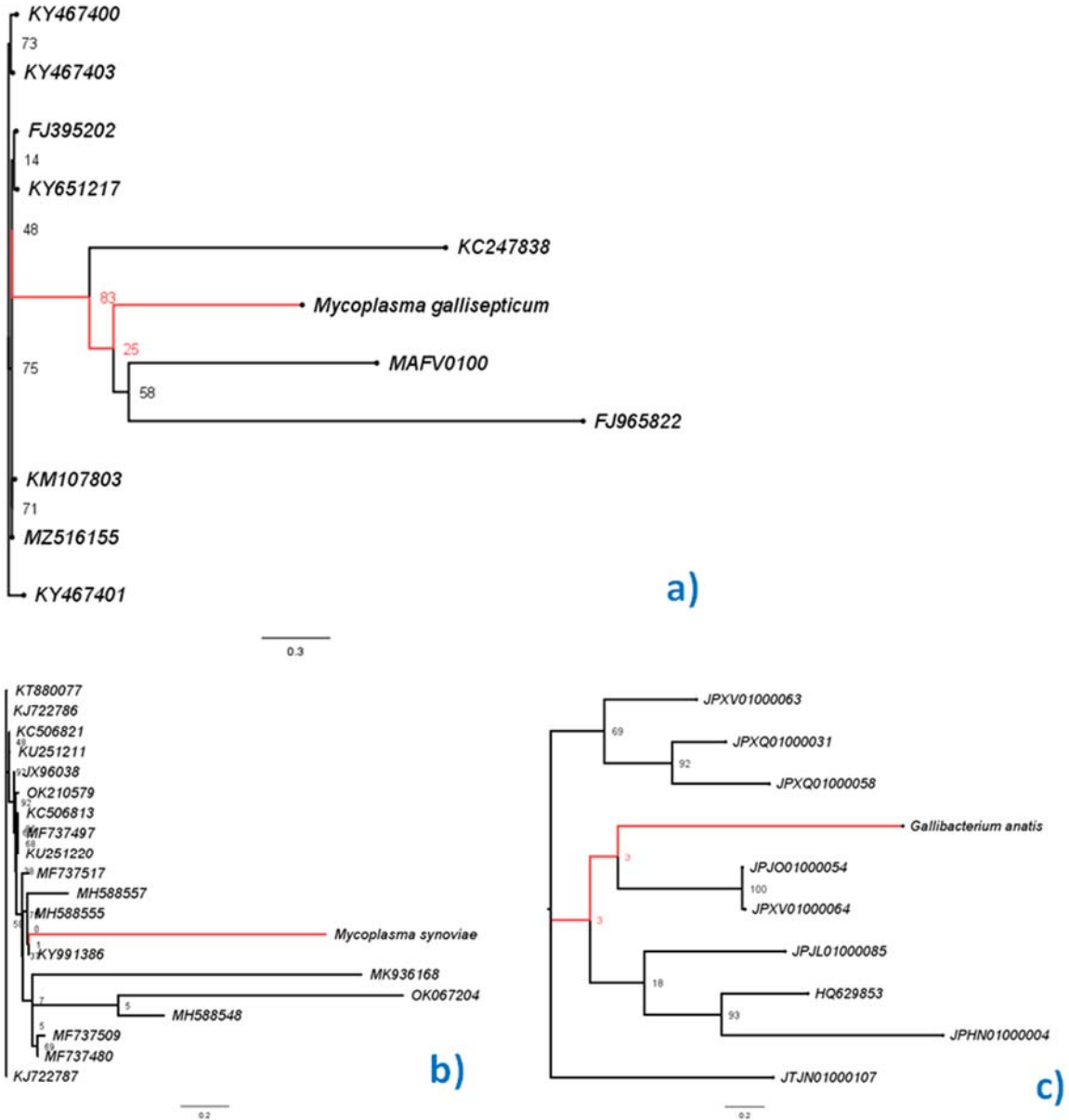


Figura 10. Árbol filogenético de los tres organismos secuenciados MG (a), MS (b) y GA (c). Los oligonucleótidos MG ARNr 23S F3 y B3 amplificaron una región de *Gallibacterium anatis* (GA) por PCR. La secuencia más común amplificada por PCR para diferentes bacterias es un fragmento de 18 nucleótidos que corresponde a B2 (GATGTCCGAATGGGGGAA) en la transición de la REI con el gen ARNr 23S. Sin embargo, excepto en *Mycoplasma tullyi* (CP059674.1) aislado de pingüinos, los oligonucleótidos LAMP MG ARNr 23S deben ser específicos para MG, ya que las regiones ARNr 23S cubiertas por los oligonucleótidos F3 y B3 susceptibles de amplificación por PCR de bacterias relacionadas como GA, *Avibacterium paragallinarum*

(AP), *Pasteurella multocida* (PM) o MS no tienen similitud con los oligonucleótidos FIP (F2-F1c) ni con la secuencia B1c de BIP en BLASTn. Algo similar se espera en la PCR con los oligonucleótidos de MS ARNr 16S F3 y B3 ya que no hay similitud significativa con las secuencias F2 de FIP o B3 en las regiones susceptibles o esperadas a amplificar de otras bacterias relacionadas como GA, AP, PM o MG. Esto podría explicar algunas discrepancias encontradas entre LAMP y PCR en este estudio. Dada la incertidumbre de la identidad de los patógenos en muestras clínicas y para optimizar recursos en la detección de infecciones múltiples, la región diana en la transición de la REI con el gen ARNr 23S (principalmente en los primeros 108 nucleótidos) podría tener potencial discriminatorio como secuencia multiobjetivo para identificar diferentes bacterias, con la subsiguiente diferenciación entre géneros bacterianos estrechamente relacionados a través de secuenciación, considerando la amplificación de ADN de otros patógenos relacionados como GA identificados en este estudio.

3.4.2 Limitaciones del estudio. Cuando los fragmentos de ARNr 23S se amplificaron mediante PCR, la identificación de las bacterias relacionadas fue ambigua y no se pudo identificar directamente mediante las bandas del gel electroforético, por lo que la frecuencia de MG de la PCR podría estar sobrestimada; por lo tanto, los microorganismos estrechamente relacionados solo podrían distinguirse mediante secuenciación. Hubo una marcada discrepancia entre LAMP y PCR en MG para los sitios de muestreo SIgC y CIS y en MS para el sitio SIgC en el centro de Sinaloa, debido a la amplificación de ADN por PCR de otras bacterias relacionadas como GA. Es importante continuar con la validación de los resultados obtenidos por LAMP con herramientas moleculares alternativas para tener mayor certeza de la aplicación práctica de LAMP para la identificación de MG y MS en campo y secuenciar en lo posible los amplicones positivos a la PCR dirigida a ARNr 23S.

3.5 CONCLUSIONES

El ADN extraído por lisis térmica permite la detección molecular y la secuenciación de amplicones de MG y MS de muestras de campo amplificadas con los nuevos oligonucleótidos LAMP ARNr 23S y 16S. La presencia de MG y MS se detectó en los seis sitios de muestreo del Noroeste de México mediante LAMP o PCR, por lo que es

necesario replantear las medidas de control para minimizar la propagación de los patógenos primarios MG y MS implicados en infecciones respiratorias y caídas de producción en gallinas ponedoras. Es recomendable extender el uso de vacunas vivas de MG y MS para bloquear los receptores en tejido respiratorio de futuras pollitas ponedoras negativas a MG y MS a las tres o cuatro semanas de edad, que hasta ahora parece ser la mejor alternativa para prevenir infecciones de MG y MS en campo. Las cepas vacunales vivas TS-11 y MS-H atenuadas artificialmente por mutagénesis química son apatógenas sin transmisión vertical porque son termosensibles con la capacidad de crecer bien a 33 °C pero mal a 39.5 °C y colonizar y persistir durante largos períodos en el tracto respiratorio superior del ave vacunada para desplazar las cepas de campo antes de que ocurra el desafío de campo. Los costos recurrentes por el uso de antibióticos y las caídas típicas de producción de 4-10% durante 3-5 semanas en toda la parvada cada vez que ocurre una reactivación de la enfermedad compensarán el costo de los productos biológicos aplicados.

3.6