



SECCION ESPAÑOLA
DE LA ASOCIACION MUNDIAL
DE AVICULTURA CIENTIFICA

XXVI SYMPOSIUM DE AVICULTURA

Reus, 23, 24 y 25 de noviembre de 1988

TRASTORNOS REPRODUCTORES EN AVES PESADAS COMO CONSECUENCIA DE LA INFECCION DEL OVIDUCTO POR MYCOPLASMA GALLINARUM

Carranza, J.,¹ Fernandez, A.,² Poveda, J. B.,¹ Martin de las Mulas, J.,²
Perea, J.A.,¹ CARRASCO, L.²

Departamento de Sanidad Animal¹

Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas²

Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba.

INTRODUCCION

Con relativa frecuencia aparecen en las aves reproductoras, trastornos que afectan especialmente a la incubabilidad y con ello a su rendimiento reproductivo. En algunas ocasiones, estas anomalías, van unidas a la presencia de aerosaculitis en los embriones, alcanzando índices del 20% de muertes perinatales. De forma general, se imolican, como agentes etiológicos, a los Mycoplasmas y, particularmente en gallinas a Mycoplasma gallisepticum.

Son escasas las referencias, en la bibliografía especializada, acerca de la acción patógena de los Mycoplasmas sobre el aparato reproductor de la gallina, por el contrario son más abundantes las que hacen alusión a los trastornos en pavos y siemore en relación con Mycoplasma meleagridis.

Una de las primeras publicaciones sobre el aislamiento de estos agentes en semen y oviducto, de pavos, se debe a McNEIL, 1957 (13).

Asimismo, en 1962, DOMERMUTH y cols., (6) ponen de manifiesto el papel de M. gallisepticum como causante de salpingitis en esta especie.

En años más recientes, PRUTHI y cols., 1980 (15), realizan estudios experimentales sobre la patología secuencial de M. gallisepticum en el tracto genital. Por otra parte, STIPKOVITS y cols., 1982 (21) asocian a los Ureaplasmas con los problemas de infertilidad en pavos.

De todas las especies conocidas de Mycoplasmas aviáres, sólo se consideran patógenos primarios para la gallina doméstica, a M. gallisepticum y M. synoviae. Existe sin embargo, una amplia lista de especies, cuya patogenicidad no está plenamente demostrada, y cuya presencia se constata frecuentemente en aves con manifestaciones clínicas, a veces, como únicos agentes de estas afecciones. La mayor parte de los Mycoplasmas son parásitos de las mucosas, y su papel patógeno está condicionado a innumerables factores biológicos, ambientales y de manejo. Las especies que con mayor frecuencia se aíslan de las aves son M. gallisepticum, M. gallinarum, M. iowae y M. synoviae (BENCINA y cols., 1987) (3), JORDAN, (1983) (10).

Los Mycoplasmas producen enfermedades e inducen toxicidad in vitro por mecanismos que no están bien definidos. Sabemos, no obstante, que algunas especies sintetizan componentes tóxicos que pueden ser aislados y caracterizados. M. gallisepticum posee una potente y labil neurotoxina. Otros, pueden inducir efecto patógeno por sus metabolitos, enzimas, peróxido de hidrógeno, amoníaco, etc.

M. gallinarum posee las mismas características de producción de peroxidasa, hemólisis y hemadsorción que M. gallisepticum (COLE y cols., 1968) (5), por lo que puede considerarse como agente potencialmente patógeno, MADDEN y cols., en 1967 (11) en un trabajo experimental con varias especies de Mycoplasmas, entre ellas M. gallisepticum y M. gallinarum sobre oollos libres de gérmenes y oollos convencionales, llegaron a la conclusión de que son necesarios nuevos estudios para determinar los efectos de los llamados "no patógenos".

Actualmente no existe una posición definida acerca de los criterios empleados para determinar la patogenicidad de los Mycoplasmas. Ello, nos está llevando a plantear nuevos modelos que permitan comprobar su acción patógena tanto in vivo como in vitro:

, Cromatografía líquida, que permita separar y analizar factores tóxicos aún en mínimas cantidades.

, Anticuerpos monoclonales

, Clonaje y recombinación de ADN

, Genética molecular

En este trabajo presentamos los resultados obtenidos a partir de aves reproductoras pesadas con trastornos de incubabilidad y procedentes de una granja donde existían varios lotes. El proceso estaba determinado por un descenso en el rendimiento de la incubabilidad, que disminuyó del 86% al 72%, especialmente a consecuencia de la muerte de embriones en cáscara. A la vez, aparecía un alto porcentaje de embriones con densa aerosaculitis, cuya mayor incidencia se encontraba en sacos aéreos

abdominales. De curso lento, el proceso se desarrolló entre 10 a 12 semanas.

MATERIAL Y METODOS

Las muestras objeto de nuestro estudio fueron tomadas de aves sacrificadas procedentes de dos lotes de reproductoras pesadas de distinta edad, que formaban parte de un núcleo donde existían otros lotes en producción normal. Estas muestras fueron sometidas a las siguientes investigaciones:

1.- Microbiológicas: El análisis bacteriológico se orientó hacia la demostración de la presencia de Enterobacterias, mediante siembra en medios universales como el Agar-sangre y en medios selectivos como el caldo selenito, agar SS y agar XLD, entre otros.

Para el aislamiento de Mycoplasmas, las muestras procedentes de tráquea, sacos aéreos y oviducto, se inocularon inicialmente en medio líquido FM4 modificado (POVEDA 1988) (14). Todas las siembras positivas fueron resemebradas en medio sólido para poder clonar las colonias según las recomendaciones del Subcomité de Taxonomía de la Clase Mollicutes (1979) (22) y proceder a una primera diferenciación bioquímica siguiendo la metodología de RAZIN y TULLY (1983) (17), empleando las siguientes pruebas: Sensibilidad a la digitonina, hidrólisis de la urea, fermentación de la glucosa y manosa, hidrólisis de la arginina, actividad

fosfatasa, producción de películas y cristales y reducción de tetrazolium en aerobiosis y anaerobiosis,

El estudio serológico de las distintas cepas aisladas se llevó a cabo por la técnica de inhibición de crecimiento (CLYDE 1964) (4) empleando sueros hiperinmunes obtenidos en conejos según la metodología de SENTERFIT 1983 (20), con las trece especies de Mycoplasmas aviares: M. anatis 1340, M. columbinasale 694, M. columbinum MMP-1, M. columborale MMP-4, M. gallinaceum DD, M. gallinarum PG16, M. gallisepticum PG31, M. gallopavonis WR1, M. iners PG30, M. iowae 695, M. meleagridis 17529, M. pullorum CCK, M. synoviae WVU1853, cedidas por el Prof. Dr E. A. FREUNDT (FAO/WHO Collaborating Centre for Animal Mycoplasmas, Institute of Medical Microbiology, University of Aarhus, Denmark.

2.- Histo-Immunopatológicas: Las muestras procedentes de oviducto (magnum e istmo) fueron fijadas en alcohol 96% y formaldehído tamponado al 10%, incluyéndose posteriormente en parafina según el método de SAINTE-MARIE (1962) (19), las fijadas en alcohol, e inclusión de rutina en parafina las fijadas en formaldehído. La tinción de las muestras se realizó mediante las técnicas de hematoxilina-eosina, PAS y carmín de Best.

En el estudio de inmunofluorescencia indirecta de estos cortes, se utilizaron como anticueros primarios, los antisueros anteriormente citados, y como secundario un suero anti conejo conjugado con

isotiocianato de fluoresceína. Para la técnica de Avidina Biotina, se emplearon los antisueros ya señalados, más el complejo comercial de avidina-biotina-peroxidasa anti conejo. Esta reacción enzimática fué revelada con DAB (diaminobencidina)

RESULTADOS

1.- Estudio Microbiológico: Todas las siembras realizadas en medios convencionales resultaron negativas, no sucediendo de la misma manera cuando se utilizó medio selectivo de Mycoplasmas. En éste se obtuvieron varios crecimientos positivos tanto a partir de tráquea como de oviducto. La identificación bioquímica y serológica reveló los siguientes resultados:

Traquea

Lote 1: 6 aislamientos de M. gallinaceum

Lote 2: 2 aislamientos de M. gallinarum

Oviducto

Lote 1: 2 aislamientos de M. gallinaceum

2 aislamientos de M. gallinarum

Lote 2: 5 aislamientos de M. gallinarum

2.- Estudio histopatológico:

Magnum: Con la técnica de hematoxilina-eosina se observó una infiltración difusa y abundante de linfocitos y células plasmáticas en la región intertubular de las glándulas tubulares de la mucosa, así como una infiltración difusa y escasa de células del tejido linfático, preferentemente células plasmáticas en la zona subepitelial de la mucosa,

En las capas submucosa y muscular se encontró tejido linfoide organizado a modo de folículos asociados a vasos, preferentemente venosos y linfáticos. Con la técnica de ácido peryodico-reactivo de Schiff (P.A.S.), el 90% de las células mostraron mucinas, indicando la actividad de este órgano en fase secretora. Por último, el 30% de las células fueron positivas con el carmin de Best, indicando presencia de glucógeno y actividad metabólica.

Istmo: No se observan modificaciones microscópicas, apareciendo las células globulares productoras de moco PAS positivas, intercaladas con células ciliadas no secretoras PAS negativas en el epitelio de la mucosa,

3.- Estudio inmunocitoquímico:

Inmunofluorescencia indirecta: En las células epiteliales de la mucosa se observan zonas positivas correspondientes exclusivamente a M. gallinarum y M. gallinaceum.

Avidina-biotina-peroxidasa: Se encuentra reacción positiva en células epiteliales, tanto ciliadas como globulosas, frente a los antisueros de M. gallinarum y M. gallinaceum.

Estas reacciones positivas sólo fueron encontradas en el magnum, no así en el istmo.

DISCUSION

Hay que destacar la presencia de M. gallinarum en las muestras de los lotes afectados y su localización concreta en la zona del magnum del oviducto, así como el no aislamiento y demostración mediante pruebas inmunocitoquímicas de otras especies, tales como M. gallisepticum, ó M. synoviae, realmente patógenas. A pesar de lo expuesto por MALLISON y cols., (1975) (12), en relación con las especies consideradas apatógenas, que con una velocidad de crecimiento superior, pueden inhibir o enmascarar la presencia de otras especies, sin embargo esta posibilidad ha sido plenamente descartada, ya que las técnicas inmunocitoquímicas sólo revelaron positividad frente a los antisueros de M. gallinarum y M. gallinaceum.

Histopatológicamente, la salpingitis localizada principalmente en el magnum, y caracterizada por la proliferación difusa de linfocitos y células plasmáticas en la mucosa, junto a una proliferación o activación del tejido linfoide asociado a vasos linfáticos y venosos, ha sido brevemente descrita tanto en casos de infecciones naturales por

Mycoplasmas en el oviducto de aves (RATHORE y cols., 1978) (16), como experimentales (BALL 1969) (2) (DOMERMUTH y cols., 1967) (6) (DOMERMUTH y GROSS 1962) (7), si bien en el caso que nos ocupa, las lesiones no son tan evidentes como las descritas por los autores mencionados, en los que hay incluso pérdida del epitelio de la mucosa y/o aparición de abundantes heterófilos. Es posible que la mayor citopatogenicidad de los Mycoplasmas aislados en aquellos casos (p. e. M. gallisepticum), ó la intervención de otros agentes infecciosos, sean la causa de la mayor intensidad de las lesiones observadas por estos autores. Así RATHORE y cols., 1978 (16) encuentra que en las infecciones combinadas con otras bacterias, la presencia de heterófilos es evidente. Por otra parte, una menor citopatogenicidad explicaría la ausencia de material caseoso en el examen macroscópico, y concuerda con las observaciones de ABU-ZAHR y BUTLER (1976) (1), en relación a una citopatogenicidad de curso más lento de M. gallinarum.

La identificación mediante técnicas inmunocitoquímicas de diferentes especies de Mycoplasmas se utiliza con frecuencia en cultivos (en especial la inmunofluorescencia directa e indirecta) (RATHORE y cols., 1978) (16), (ERND 1977) (8), ó en algunos casos, y especialmente en mamíferos, sobre material congelado, sin embargo, el uso de estas técnicas sobre material fijado, u especialmente en órganos reproductores, no es común.

La correlación observada en nuestro estudio entre las especies de Mycoplasmas identificadas por métodos microbiológicos e

inmunocitoquímicos (M. gallinarum y M. gallinaceum) y las no afectadas por ninguno de los dos métodos junto a la negatividad de todos los controles específicos de los métodos inmunocitoquímicos en ambos materiales afirman que estos métodos pueden ser utilizados para identificar "inocuas" "in situ". Este hecho ofrece una importante ventaja sobre los análisis microbiológicos en los que un mayor poder de crecimiento de algunas especies, ó algún fallo en el aislamiento, podrían enmascarar la identificación de los verdaderos agentes etiológicos causantes de estos trastornos.

Es importante resaltar el hecho de que en nuestro trabajo al igual que en algunos realizados sobre tejidos de mamíferos con muestras fijadas hemos demostrado inmunoreactividad en material fijado en alcohol pero no en formal (se investiga en estos momentos) habiendo sido recogidas las muestras inmediatamente después de sacrificar los animales, caso similar al descrito por RATHORE y cols., 1978 (16), que fracasó en un intento de identificación de *Mycoplasmas* mediante técnicas inmunocitoquímicas en material congelado, igualmente de oviductos con características similares a las de este brote.

La presencia de una reacción linfoproliferativa en el magnum, zona en la que detectamos positividad frente a M. gallinarum y M. gallinaceum, y la escasez o ausencia de la misma en las zonas carentes de inmunoreactividad, apoyan las afirmaciones de diversos autores (BALL 1969) (2) (DOMERMUTH y cols., 1967) (6) (DOMERMUTH y GROSS 1962) (7) (RHODES 1971) (18) (RATHORE y cols., 1978) (16), en el sentido de que

este tipo de reacción corresponde a una respuesta inmunológica (caracterizada por linfocitos y células plasmáticas), de carácter lento y progresivo, a causa de la localización superficial e intracelular de antígenos, circunstancia que impide al sistema inmunitario defensivo un contacto más directo en la captación y reconocimiento del Mycoplasma. Esto no sucede con otros agente patógenos (fundamentalmente otras bacterias), cuya acción citolítica es más intensa.

El cuadro clínico-lesional, junto a la exclusión de otra posibles causas, y la identificación microbiológica e inmunocitoquímica en zonas metabólicamente importantes del oviducto, nos permiten concluir, no sin alguna reserva (pruebas de patogenicidad), que en este brote intervienen de forma primaria M. gallinarum y M. gallinaceum.

BIBLIOGRAFIA

- 1.-ABU-ZAHR, M.N., and M. BUTLER, 1976. Growth cytopathogenicity and morphology of Mycoplasma gallisepticum and M. gallinarum in tracheal explante, J. Comp. Pathol, 86:455-465.
- 2.- BALL, R.A, 1969, The morohologic response of the turkey oviduct to certain pathogenic agents, Avian Dis, 13: 119-133.
- 3.- BENCINA, D., D. DORRER, and T. TADINA, 1987, Mycoplasma species isolated from six avian soecies, Avian Pathol, 16: 653-644.
- 4.- CLYDE, W.A,Jr, 1964, Mycoplasma species identification based upon growth inhibition by specific antisera, J. Immunol, 92: 958-965.

- 5.- COLE, B.C., J.R. WARD, and C.H. MARTIN, 1968, Hemolysin and peroxide activity of mycoplasmas species, J. Bacteriol, 95:
- 6.- DOMERMUTH, C.H., W.B. GROSS, and R.T. DEBOSE, 1967, Mycoplasma salpingitis of chickens and turkeys, Avian Dis, 11: 393-398.
- 7.- DOMERMUTH, C.H. and W.B. GROSS, 1962, The production of salpingitis of chickens by Mycoplasma gallisepticum, Avian Dis, 6: 499-505.
- 8.- ERNO, H, 1977, Mycoplasmas: Use of polyvalent antisera for identification by indirect immunofluorescence, Acta Vet, Scand, 18: 176-186.
- 9.- HILL, A.C, 1978, Demonstration of mycoplasma in tissue by the immunoperoxidase technique, J. of Infect, Diseases, 137: 152-154.
10. JORDAN, F.T.W, 1983, Recovery and identification of avian mycoplasmas, In: Methods in Mycoplasmaology, Vol 2, Tully, J.G and Razin, S, eds, New York, Academic Press pp 69-79.
- 11.- MADDEN, D.L., W.H. HENDERSON, and H.E. MOSES, 1967, Isolation of Mycoplasma gallisepticum from bobwhite quail (Colinus virginianus), Avian Dis, 11: 378-380.
- 12.- MALLISON, E.T, and M. ROSENSTEIN, 1975, Clinical, cultural and serologic observations of avian mycoplasmosis in two chicken breeder flocks, Avian Dis 25: 211-215.
- 13.- McNEIL, E, 1957, Abstr, Poultry Sci, 36: 1140.
- 14.-POVEDA, J.B, 1988, Estudio epizootiológico de infecciones por microorganismos del Género Mycoplasma en aves, Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba.

- 15.- PRUTHI, A.K. and M.U. KHAROLE, 1980, Sequential pathology of genital tract in chickens experimentally infected with *Mycoplasma gallisepticum*, *Avian Dis*, 25: 768-778.
- 16.- RATHORE, B.S., G.C. MOHANTY, and B.S. RAJYA, 1978, Mycoplasmal salpingitis in chickens: pathologic and immunofluorescent studies, *Indian J. Vet. Path.*, 3: 15-17.
- 17.- RAZIN, S. and J.G. TULLY, 1983, Biochemical and enzymatic test in mycoplasma identification, In *methods in Mycoplasmaology*. Vol I, Razin, S. and J.G. Tully, eds, New York, Academic Press pp 335-391.
- 18.- RHOADES, K.R. 1971, *Mycoplasma meleagridis* infection: reproductive tract lesions in mature turkeys, *Avian Dis*, 722-729.
- 19.- SAINTE-MARIE, G. 1962, A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence, *J. Histochem. Citochem* 10: 250-256.
- 20.- SENTERFIT, L.B. 1983, Preparations of antigens and antisera, In *methods in mycoplasmaology*, Vol I, Razin, S. and J.G. Tully eds, Academic Press, New York, pp 401-404.
- 21.- STIPKOVITS, L., P.A. BROWN, R. GLAVITS, and R.J. JULIAN, 1982, The possible role of *Ureaplasma* in continuous infertility problem in turkeys, *Avian Dis*, 27: 513-523.
- 22.- SUBCOMMITTEE ON THE TAXONOMIA OF MOLLICUTES, 1979, Proposal of minimal standards for descriptions of new species of the class Mollicutes, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 29: 172-180.