REDVET - Revista electrónica de Veterinaria - ISSN 1695-7504
Vol 25, No.1 (2024)
http://www.veterinaria.org
Article Received: Revised: Published:

Optimización de una PCR duplex para la detección de *Mycoplasma Gallisepticum*y *Mycoplasma Synoviae* en muestras de tejidos de *Gallus gallus*

Optimization of a duplex PCR for detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in tissue samples from *Gallus gallus*

Víctor Chávez-Montenegro[1,2,3,4], Vladimir Longa-Bobadilla[1], Débora Alvarado Iparraguirre[2], Luis Tataje-Lavanda[1,5], Manolo Fernández-Díaz[1]

[1] Laboratorios de Investigación y Desarrollo de Farmacológicos Veterinarios (FARVET) S.A.C., Chincha Alta, Ica, Perú
[2] Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú, E-mail: biologovechm@gmail.com
[3] Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional del Callao, Callao, Perú
[4] Unidad Médico Legal, Instituto de Medicina Legal II Lima Norte, Lima, Perú
[5] Escuela Profesional de Medicina Humana, Universidad Privada San Juan Bautista filial Ica. Ica, Perú

RESUMEN
El objetivo del trabajo fue optimizar la PCR dúplex para la detección de *Mycoplasma gallisepticum* (MG) y *Mycoplasma synoviae* (MS) en muestras de tejido traqueal en *Gallus gallus* con la finalidad de ahorrar tiempo y recursos económicos en su diagnóstico. La metodología consistió realizar una evaluación *in silico* de los cebadores ideales para su detección, se les realizó las primeras pruebas como concentración de cebadores, sensibilidad y especificidad, paso seguido se determinó la prevalencia en muestras de diferentes galpones a nivel nacional durante un periodo de 4 años. Una vez finalizadas las primeras pruebas se escogieron a los cebadores ideales (MG 3 y MS 2) para la PCR duplex llegando a tener una sensibilidad y especificidad mayor al 99%. Esta técnica se puso en práctica y se analizaron de 669 muestras de tejido traqueal de pollo en las cuales se detectó que 45 muestras dieron positivo para MG y/o MS. Finalmente, las muestras positivas fueron secuenciadas en Macrogen-Korea. Se determinó poca prevalencia de estos patógenos en las muestras analizadas, pero el resultado es de mucha importancia debido a que existe la posibilidad de una propagación de estos patógenos en galpones y ocasionar grandes pérdidas en el sector avícola.

Palabras clave: PCR duplex, *Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma synoviae* sensibilidad, especificidad y prevalencia

ABSTRACT
The objective of the work was to optimize duplex PCR for the detection of Mycoplasma gallisepticum (MG) and Mycoplasma synoviae (MS) in tracheal tissue samples in Gallus gallus in order to save time and economic resources in their diagnosis. The methodology consisted of carrying out an in silico evaluation of the ideal primers for their detection, the first tests such as primer concentration, sensitivity and specificity were carried out, followed by determining the prevalence in samples from different poultry houses at national level during a period of 4 years. Once the first tests were completed, the ideal primers (MG 3 and MS 2) were chosen for duplex PCR, achieving a sensitivity and specificity greater than 99%. This technique was put into practice and 669 samples of chicken tracheal tissue were analyzed, in which 45 samples were found to be positive for MG and/or MS. Finally, the positive samples were sequenced in Macrogen-Korea. The prevalence of these pathogens was found to be low in the samples analyzed, but the result is of great importance because of the possibility of spreading these pathogens in poultry houses and causing great losses in the poultry sector.

Key words: duplex PCR, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, sensitivity, specificity and prevalence.

INTRODUCCIÓN

La micoplasmosis aviar es una enfermedad de que ocasiona grandes pérdidas en la industria avícola (Buim *et al*., 2009). Las bacterias que causan esta enfermedad pertenecen a la clase Mollicutes, con un genoma que va desde 580 hasta 2200 kb, se caracterizan por carecer de peptidoglicano y se encuentran filogenéticamente relacionadas con bacterias grampositivas con genomas bajos en (G + C)% (Pollack *et al*., 1997).

Las bacterias que más afectan al sector avícola pertenecen al género *Mycoplasma* destacando cuatro especies: *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. meleagridis* y *M. iowae*, siendo los dos primeros los más importantes por afectar mayormente a pollos. Estas bacterias causan enfermedades respiratorias en aves comerciales (Meza *et al*., 2017, Kursa *et al*., 2019, Gómez *et al*., 2021), tienen una amplia variedad de factores de virulencia que les permiten superar numerosas barreras de entrada al hospedador; un ejemplo de ello son las adhesinas que pueden unirse a los receptores o la matriz

extracelular de la célula huésped obteniendo nutrientes preformados, así como formar biopelículas con el fin de colonizar, invadir y persistir en el huésped (Noormohammadi, 2007).

La micoplasmosis aviar ocasionada por *M. gallisepticum* y *M. synoviae* se propaga rápidamente en los galpones ya que son ambientes cerrados y con mayor densidad poblacional de aves (Bagheri *et al*., 2011). Las vías de propagación son la horizontal, a través de aerosoles infecciosos tosidos o estornudados por aves infectadas y por alimentos contaminados, y la vía vertical de padres a hijos, a través de la contaminación de los huevos (transmisión transovárica) (Charlton *et al*., 1996). *M. gallisepticum* induce la enfermedad respiratoria crónica grave en pollos, causando tos, estornudos, chasquidos, estertores, disminución del consumo de alimentos y aumento de la mortalidad (Davidson *et al*., 1982), mientras que *M. synoviae* causar artritis, sinovitis, enfermedades respiratorias, inmunosupresión y aumento de la mortalidad, así como reducción de la producción e incubabilidad de huevos en pollos y pavos (Landman *et al*., 2012).

Las pruebas de diagnóstico de laboratorio tradicionalmente utilizadas para la detección de estos patógenos son la prueba de aglutinación rápida en placa, la técnica de ELISA y la prueba de inhibición de la hemaglutinación (Cerdá, 2007); sin embargo, estas pruebas no detectan la especie patógena específica, requieren de mayor tiempo de trabajo y pueden dar resultados falsos positivos. Actualmente se viene usando la técnica PCR como *gold standard* - prueba confirmatoria debido a su alta sensibilidad y especificidad (Feberwee *et al*., 2005). No obstante, se tiene la posibilidad de acelerar el diagnóstico molecular mediante la PCR multiplex, la cual permite detectar varios patógenos, ahorrando tiempo, materiales y reactivos (Fraga *et al*., 2013).

Hoy en día, en diferentes partes del mundo como Brasil (Metiifogo *et al.,* 2015; Buim et al., 2009), Bélgica (Michiels et al., 2016), Myanmar (Fujisawa *et al.,* 2019) y otros, ya están utilizando la técnica de PCR multiplex para la detección de estas especies de interés comercial debido a las facilidades ya mencionadas, sin embargo, en el Perú no se han reportado investigaciones relacionadas al uso de la PCR dúplex para la detección de *M. gallisepticum* y *M. synoviae* en *Gallus gallus*. Es por ello el objetivo del presente estudio de optimizar esta técnica para una mejor detección de los dos patógenos causantes de micoplasmosis aviar en el país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas Bacterianas

Las cepas de *M. gallisepticum* (MG) y *M. synoviae* (MS) fueron donadas por la empresa FARVET S.A.C. (Perú), así como otras cepas de virus y bacterias del sector avícola, las cuales se usaron como controles para la prueba de especificidad.

Extracción de ADN

Se extrajo el ADN de MG y MS siguiendo las indicaciones del QIAamp MinElute Virus Spin Kit (QIAgen, Alemania). Se calculó el grado de pureza en relación entre el porcentaje de ácidos nucleicos y de proteínas, verificando la proporción de lecturas entre las absorbancias 260 nm/280 nm (Warburg *et al*. 1942) y se cuantificó el ADN bacteriano en un Fluorómetro Qubit 2.0 (Life Tecnologies, USA), tomando en consideración la cantidad de ADN obtenida y los datos del tamaño total del genoma de MG y MS. Este proceso se hizo en base a la fórmula:

$$N° \; copias \; bacterianas = \frac{\text{X ng.} * 6{,}0221 * 10^{23} molecu./mol}{\left(N * 660 \frac{g}{mole}\right) * 10^{9} \; ng/g}$$

Donde: X= Cantidad promedio del amplicón, N= Longitud del amplicón

Cebadores

Los cebadores fueron seleccionados gracias a la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), donde se comprobó que estaban dirigidos a los a los genes *gapA*, *mgc2* y 16S ARNr del genoma de MG (Nascimento et al. 2009, Nascimento et al.1991; Papazisi *et al*., 2002; Evans, 2008) y a los genes 16S RNAr y *vlhA* del genoma de MS (Lauerman *et al.*, 1993; Kojima *et al.*, 1997; Hong *et al.*, 2004; Hammond *et al.*, 2009), se comprobó su ubicación en el genoma de cada patógeno con ayuda del programa bioinformático Snap Gene Viewer v. 3.3.3 (GSL Biotech, USA). Una vez definido los cebadores a usar se procedió a sintetizarlos por medio de la empresa Integrated DNA Technologies (IDT, USA). Las secuencias de los cebadores se presentan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Características de los cebadores dirigidos a las regiones del genoma de *Mycoplasma gallisepticum* (MG) y *Mycoplasma synoviae* (MS)

Bacteria	Nombre interno	Nombre	Secuencias (5´-------- 3´)	Longitud (pb)	Tm[1] (°C)
Mycoplasma gallisepticum	MG 1 (gapA) *	MG-f	ggatcccatctcgaccacgagaaaa	732	60.3
		MG-r	ctttcaatcagtgagtaactgatga		52.9
	MG 2 (mgc2) *	MGF-f	taacccttcatcacctcatctagag	524	55.3
		MGF-r	ctgtttgctaaagaacaagttgatc		52.9

Mycoplasma synoviae	MG 3	MG-F	cgcaatttggtcctaatccccaaca	303	59.7
	(mgc2)	MG-R	taaacccacctccagctttatttcc		57.1
	MG4	Mg14F	gagctaatctgtaaagttggtc	185	51
	(16S rRNA)	Mg13R	gcttccttgcggttagcaac		57
	MG 5	PRUMG30-F	tttggaagcgtaagatctgaaa	222	52.3
	(gapA) *	PRUMG31-R	tccggcttttgttcagttaga		54.2
	MG 6	PRUMG32-F	gaactgattttggaagcgtaaga	110	53.4
	(gapA) *	PRUMG36-R	ccgttatatcatcctgaatctcct		53.7
	MS 1	MS-F	ccattgctcctgctgttat	295	52.7
	(vlhA)	MS-R	gattctgttgtagttgcttcaa		51.1
	MS 2	MS-f	gagaagcaaaatagtgatatca	207	48
	(16S RNAr) *	MS-r	cagtcgtctccgaagttaacaa		54.6
	MS 3	M1-F	gctgcggtgaatacgttct	163	55.4
	(16S RNAr) *	M2-R	tccccacgttctcgtaggg		58.8
	MS4	MS-1	gaagcaaaatagtgatatca	207	45.1
	(16S RNA) *	MS-2	gtcgtctccgaagttaacaa		52.2
	MS 5	vlhA-F	attagcagcta gtgcagtggcc	388	59.7
	(vlhA)	vlhA-R2	agtaaccgatccgcttaatgc		55.1

[1] Temperatura de fusión, calculada por el sintetizador IDT

Programación de la corrida

La programación de la corrida para *M. gallisepticum* / *M. synoviae* se hizo en base al Protocolo Q5® High-Fidelity 2X Master Mix (NEB, EE. UU), para ello se usó el termociclador Mastercycler proS, (Eppendorf, EE. UU), la programación comenzó con una desnaturalización inicial a una temperatura de 98°C por medio minuto, paso seguido se optó por programar una etapa 30 ciclos empezando con una desnaturalización a 98°C por 10 segundos, una etapa de hibridación a 52°C por 20 segundos; para obtener esta temperatura se consideró la temperatura de hibridación de los cebadores la cual oscila entre los 45 °C hasta 60°C que mediante prueba de ensayo y error se consideró la ideal, una etapa de extensión a una temperatura de 72°C por 18 segundos y una extensión final de 72°C por 120 segundos.. Las bandas se visualizaron mediante la electroforesis en gel de agarosa al 2%, con una carga eléctrica de 80 voltios por un periodo de una hora aproximadamente. Cada prueba sirvió como filtro para seleccionar a los mejores cebadores para la PCR dúplex.

Prueba de Concentración de Cebadores

Una vez obtenido las temperaturas idóneas y los tiempos adecuados en la programación para cada etapa de la PCR, se procedió a preparar el Master Mix en diferentes concentraciones de los cebadores desde 1, 0.75, 0.50, 0.25 y 0.20 µmol/L, cada corrida se realizó por duplicado. Se eligió la menor concentración de los cebadores que expresan bandas específicas de los amplicones en la electroforesis con la finalidad de demostrar que se puede trabajar a concentraciones bajas obtenido mismos resultados en la expresión de las bandas.

Preparación del Master Mix

Una vez obtenido la temperatura de hibridación idónea, así como la concentración de los cebadores se procedió a preparar el Master Mix (Cuadro 02). El volumen de cada componente para la PCR dúplex, se basó en el inserto de Q5® High-Fidelity 2X Master Mix.

Cuadro 2. Fórmula del Master Mix para PCR multiplex

Componentes	1 x
Q5 High-Fidelity 2X Master Mix	11 µl
Forward primer (MG) 0.25 µmol/l	0.5 µl
Reverse primer (MG) 0.25 µmol/l	0.5 µl
Forward primer (MS) 0.25 µmol/l	0.5 µl
Reverse primer (MS) 0.25 µmol/l	0.5 µl
Agua libre de nucleasas	5 µl
ADN de *M. gallisepticum*	2 µl
ADN de *M. synoviae*	2 µl
Total	22 µl

Adicionalmente se realizaron 10 diluciones logarítmicas seriadas del material genético amplificado de nuestros patógenos de interés (Cuadro 3), con la finalidad de determinar el límite de detección de los amplicones de ADN bacteriano, mediante la electroforesis, consideración las bandas específicas con un mayor número de diluciones.

Cuadro 3. Diluciones sucesivas del ADN de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* desde 10 ng/µl hasta 1 ag/µl

Mycoplasma gallisepticum y Mycoplasma synoviae	
Dilución sucesiva Cantidad de amplicón	ADN ds Copias bacterianas en pb
10 ng/µl	10^7
10^3 pg/µl	10^6
10^2 pg/µl	10^5
10 pg/µl	10^4
10^3 fg/µl	10^3
10^2 fg/µl	10^2
10 fg/µl	10^1
10^3 ag/µl	1

Pruebas Estadísticas

Prueba de especificidad y de sensibilidad

Para determinar la especificidad y sensibilidad se utilizó el material genético de las cepas de virus y bacterias que más afectan el sector avícola, como adenovirus aviar tipo 4 (FAdV-4), Virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (IBDV), virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), virus de bronquitis infecciosa (IBV), virus de anemia aviar (CAV), virus de laringotraqueítis infecciosa (ILTV), metapneumovirus aviar (AMPV), síndrome de caída de la postura (EDS), *Pasteurella* spp, *Salmonella gallinarum*, ADN puro de células de fibroblasto de pollo (DF1), y agua libre de nucleasas (H_2O). Luego se procedió a realizar la corrida y lectura en el gel de agarosa al 2% considerando los cebadores específicos para la detección de *M. gallisepticum* y *M. synoviae*, teniendo en cuenta la especificidad de las bandas de los amplicones.

Se usaron las cepas de virus y bacterias que más afectan al sector avícola nacional. En reportes internacionales se ha demostrado que estos dos patógenos atacan mayormente a galpones de pollos siendo la industria avícola más grande en el Perú, conllevando a tener un mayor impacto económico mientras que las otras (bacterias del género Mycoplasma) no han reportado ello.

Las fórmulas para las pruebas estadística fueron: Sensibilidad = A / (A+C) y para Especificidad = D / (D+B), además se calculó el valor predictivo positivo (VPP) = A / (A+B), el valor predictivo negativo (VPN) = D / (C+D) y la exactitud = (A +D) / A + B + C + D). El significado de cada letra se explica al detalle en el cuadro 4.

Detección de *M. gallisepticum* y *M. synoviae* en Tejido Traqueal

Una vez demostrado que nuestros cebadores seleccionados rigurosamente, eran específicos para la detección de *M. gallisepticum* y *M. synoviae*, se procedió a usarlos para su detección en muestras de tejido traqueal (435 muestras en tubos Eppendorf y 234 muestras impregnadas en tarjeta FTA®) desde el 2016 al 2019. El criterio de inclusión para el análisis molecular fue: muestras de tejido traqueal pertenecientes a la especie aviar *Gallus gallus* procedentes de galpones a nivel nacional. Las muestras que venían en tubos Eppendorf de plástico se aceptaban si llegaban bajo cadena de frio.

Prevalencia

La tasa de morbilidad mide la frecuencia de la enfermedad en una población específica, relacionando el número de enfermos con la población a la cual pertenece. Este proceso se mide mediante la prevalencia, la cual mide la proporción de muestras positivas al momento de evaluar a la población (Keiding, 1991; Bhopal, 2016). Se emplearon las siguientes fórmulas para calcular la: Prevalencia = (Casos nuevos y preexistentes en un periodo) / Población total en el periodo) * 100.

Este procedimiento se realizó con la finalidad de demostrar si hay ausencia o presencia de estas especies bacterianas en muestras de tejidos de *Gallus gallus* provenientes a nivel nacional (Perú), se comparó prevalencia entre ambas especies bacterianas y se confrontó la data obtenida con la internacional a fin de ver si existió relación.

Cuadro 4. Representación esquemática para calcular la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y exactitud

Resultados	Muestras positivas	Muestras negativas	Total
Positivos	A	B	A+B
Negativos	C	D	C+D
Total	A+C	A+D	N

A = Verdaderos positivos, C: Falsos negativos, B: Falsos positivos, D: Verdaderos negativos, y N: Total

Secuenciamiento de *M. gallisepticum* y *M. synoviae* en Muestras Positivas

REDVET - Revista electrónica de Veterinaria - ISSN 1695-7504
Vol 25, No.1 (2024)
http://www.veterinaria.org
Article Received: Revised: Published:

El secuenciamiento del material genético de las muestras que salieron positivas se realizó por medio de la empresa Macrogen (Corea) con la finalidad de saber si existe comparación con otras cepas de *M. gallisepticum* y *M. synoviae* en las bases de datos de las herramientas Bioinformáticas (NCBI).

RESULTADOS

El porcentaje de ácidos nucleicos obtenidos de nuestras cepas bacterianas fue 65% para *M. gallisepticum* y 60% para *M. synoviae*, ambos se encontraron dentro de los valores aceptables que están entre 1.80* a 2.00 (Warburg *et al*. 1942), así mismo el número de copias bacterianas fue de 10^7 para ambos.

Los cebadores que fueron seleccionados correspondieron a MG 3 y MS 2, ya que pasaron todas las pruebas y presentaron una alta sensibilidad y especificidad. Las bandas de los amplicones se visualizaron con concentraciones de cebadores a 0.25 µmol/l.

Los resultados de la lectura de nuestro Master Mix en base al inserto de Q5® High-Fidelity 2X Master Mix, se observò que las bandas de los cebadores seleccionados amplifican correctamente (Figura 1) para la detección simultánea de *M. gallisepticum* y *M. synoviae* evaluando su especificidad con las demás cepas bacterianas y virales.

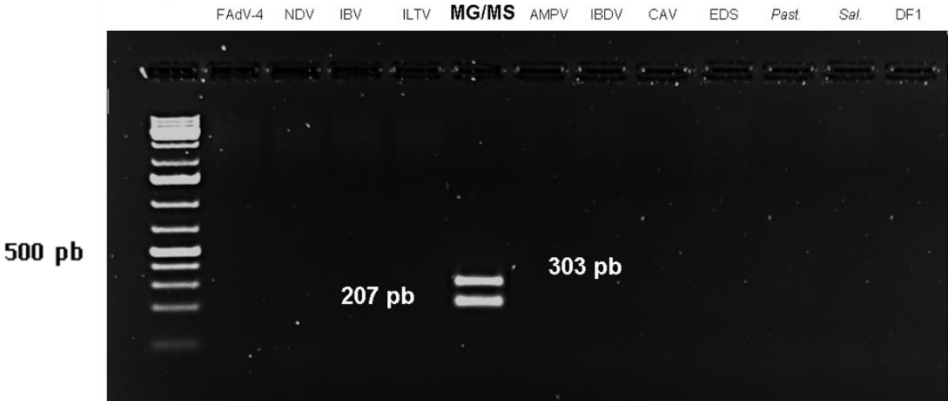

Figura 1. Corrida electroforética de la prueba de especificidad usando los cebadores finalistas para la detección de *M. gallisepticum* (MG 3) y *M. synoviae* (MS 2) usando las cepas bacterianas y virales como controles

Los cebadores MG 3 y MS 2, en la PCR multiplex, tuvieron una sensibilidad y especificidad de 100% (Cuadro 5)

Cuadro 5. Valores obtenidos para determinar las pruebas estadísticas de los cebadores de *M. gallisepticum* (MG 3) y *M. synoviae* (MS 2)

	Muestras positivas	Muestras negativas	Total
Positivos	1	0	1
Negativos	0	11	11
Total	1	11	12

Sensibilidad = 100%; Especificidad = 100%

Los resultados de las 669 muestras de tejido traqueal se presentan en el Cuadro 6. La prevalencia para MG fue de 1.79%, para MS de 2.84% y para ambas bacterias de 2.09% durante el periodo 2016 al 2019**.**

Cuadro 6. Muestras analizadas para determinar la prevalencia e incidencia de *Mycoplasma gallisepticum* (MG) y *M. synoviae* (MS)

Año	Tejido traqueal licuado de *Gallus gallus*							
	Tipo de soporte	Muestras positivas				Muestras negativas	Muestras analizadas	Muestras analizadas
		MG	MS	MG/MS	Total			
2016	Tubos eppendorf	1	0	1	2	90	92	148
	Tarjeta fta®	0	1	1	2	54	56	
2017	Tubos eppendorf	2	3	2	7	114	121	191
	Tarjeta fta®	0	1	1	2	68	70	
2018	Tubos eppendorf	3	5	3	11	89	100	143
	Tarjeta fta®	1	1	1	3	40	43	
2019	Tubos eppendorf	4	6	3	13	109	122	187
	Tarjeta fta®	1	2	2	5	60	65	
Total	Tejido licuado	10	14	9	33	402	435	669
	Tarjeta fta®	2	5	5	12	222	234	

El 6.73% del total de muestras analizadas dio positivo para MG y/o MS, 33 muestras positivas (4.93%) pertenecían a tejido licuado en Tubos Eppendorf PCR, mientras que las 12 muestras positivas procedían de tarjeta FTA®(Cuadro 7).

Como dato adicional se demostró que existe un 100% de similitud de *M. synoviae* encontrada en muestras de tejido traqueal con la cepa HN01; así mismo *M. gallisepticum* presenta una similitud del 99.65% con la cepa EgPk1UAF08 y un 97.29% con la cepa UNVD14 (Cuadro 8).

Cuadro 7. Número y porcentaje () de muestras positivas en relación al total de muestras analizadas

	M. gallisepticum	*M. synoviae*	*M. gallisepticum* / *M. synoviae*	Muestras positivas	Total
Tubos Eppendorf	10 (1.49)	14 (2.09)	9 (1.34)	33 (4.9)	435 (65.02)
Tarjeta FTA®	2 (0.30)	5 (0.75)	5 (0.75)	12 (1.79)	234 (34.98)
Total	12 (1.79)	19 (2.84)	14 (2.09)	45 (6.73)	669 (100)

Cuadro 8. Similitud de las muestras positivas de *Mycoplasma gallisepticum* (MG) y *Mycoplasma synoviae* (MS) de galpones nacionales frente a cepas identificadas en la base de datos de NCBI – BLAST

Tipo de soporte	Cebadores	nt	Gen	Organismo	Cepa	Ident (%)
Tubos Eppendorf	MG 3	288	Mgc2	*Mycoplasma gallisepticum*	EgPk1UAF08	99.65
	MS 2	211	16 S	*Mycoplasma synoviae*	HN01	100
Tarjeta FTA®	MG 3	258	Mgc2	*Mycoplasma gallisepticum*	UNVD14	97.29
	MS 2	211	16 S	*Mycoplasma synoviae*	HN01	100

DISCUSIÓN

En este estudio se utilizó el BioPhotometer plus (Eppendorf, EE. UU) para evaluar la pureza de nuestras cepas *de M. gallisepticum* y *M synoviae* con OD260:OD280 de 1.93 y 1.91, respectivamente, siendo valores aceptables desde 1,80 a 2,00 (Warburg et al. 1942). El porcentaje de ácido nucleico fue de 65% y 60% para *M. gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* respectivamente.

Más de la mitad (64%) de aislados dieron positivo a *M. gallisepticum*, los cebadores que se usaron para su detección van dirigidos al gen mgc2, el cual codifica proteínas de superficie que están relacionadas con la citoadherencia (Raviv *et al*., 2013), mientras que para la detección de *M. synoviae* en diferentes investigaciones se usaron cebadores que amplificaron la región de ARNr 16S y los genes vlhA (Hong, 2004; Lauerman, 1993; Kojima, 1997; Hammond, 2009) sin embargo para nuestra optimización de nuestra PCR dúplex el ideal fue el cebador dirigido a la región ARNr 16S.

La programación de la corrida así como los volúmenes de cada insumo del master Mix se basaron en el Protocolo Q5® High-Fidelity 2X Master Mix (NEB, USA), el cual presenta un MIX con 2.0 mM de Mg++, una concentración final de cada desoxinucleótido dNTP de 200 µM, una ADN polimerasa de alta fidelidad Q5 (~280 veces más alta que Taq) cuya tasa de error es de 5.3×10^{-7} (Potapov *et al*., 2017).

El proceso de optimización consistió en: demostrar que al elegir la mínima concentración de los cebadores también se pueden observar las bandas específicas de los amplicones con el fin de ahorrar insumos, evidenciar una eficaz programación para la corrida de la PCR en el termociclador, verificar hasta qué cantidad de material genético se pueden observar las bandas de los amplicones al realizar las diluciones logarítmicas. La optimización de la PCR dúplex se demostró al detectar si ambas especies bacterias se encontraban en 669 muestras de tejido traqueal de *Gallus gallus*.

El trabajo se enfocó en la optimización de una PCR dúplex para la detección de los dos patógenos en una corrida. Esta investigación logró detectar, mediante la técnica molecular optimizada, 45 muestras positivas para MG y/o MS (6.73%), la prevalencia para MG fue de 1.79%, para MS de 2.84% y para ambas bacterias de 2.09% durante el periodo 2016 al 2019.

Los casos de *M. synoviae* han ido en aumento en los últimos 15 años (Felice *et al*., 2020). En esta investigación se logró detectar 19 muestras con *M. synoviae* (2.1% tejido en Tubos Eppendorf y 0.7% en tejido impregnado en tarjeta FTA®) representando el 2.8% del total, siendo un 37% mayor que el resultado de *M. gallisepticum.* Este resultado es muy bajo en comparación a otros trabajos realizados en otros países donde el resultado es mayor al 55% (Bayatzadeh, 2011).

Hasta el momento no existen estudios científicos sobre el diagnóstico molecular de *M. gallisepticum* y *M. synoviae* en el Perú; sin embargo, se dispone de reportes del Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) – Perú, donde indican la presencia de aves de corral infectadas sin mencionar la técnica de diagnóstico utilizada y la mayoría de estos reportes solo mencionan a *M. gallisepticum* (SENASA, 2020).

Estos resultados se consideran importantes debido a que existe la evidencia de una probable propagación, y en cierta manera, usando estas técnicas de PCR multiplex, mejoraría los programas de control de la micoplasmosis aviar. Adicionalmente se mandaron a secuenciar las muestras positivas y se demostró que éstas tenían una similitud a otras cepas, como es el caso de *Mycoplasma gallisepticum* positiva en tejido licuado con la cepa EgPk1UAF08 con un 99.65% y la cepa UNVD14, positiva en Tarjeta FTA®, así mismo para *Mycoplasma synoviae* con similitud de hasta un 100%.

CONCLUSIONES

- Se logró optimizar la PCR multiplex para la detección de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae* en muestras de tejidos traqueales de *Gallus gallus*, mediante un proceso riguroso desde la selección de los cebadores, al pasar por las pruebas de concentración y estadísticas demostrando que los cebadores seleccionados fueron 100% sensibles y específicos.
- Los resultados fueron que la prevalencia de ambas bacterias fue de 2.09%, mientras que la incidencia fue de 2.24% en un periodo de cuatro años.

LITERATURA CITADA

1. Bagheri H., Doosti A., Arshi A. Detection of Mycoplasma gallisepticum in Chaharmahal Va Bakhtiari Province poultry using PCR. Global Veterinaria. 2011;7(1):54–59.
2. Bayatzadeh MA, Pourbakhsh SA, Homayounimehr AR, et al. Application of culture and polymerase chain reaction (PCR) methods for isolation and identification of Mycoplasma synoviae on broiler chicken farms. Arch Razi Inst. 2011;66(2):87–94.
3. Bhopal R. Concepts of epidemiology: integrating the ideas, theories, principles, and methods of epidemiology. Oxford: Oxford University Press; 2016.
4. Buim M, Mettifogo E, Timenetsky J, Kleven S & Ferreira A. 2009. Epidemiological survey on Mycoplasma gallisepticum and M. synoviae by multiplex PCR in commercial poultry. Pesq. Vet. Bras. 29:552-556.
5. Buim, Marcos Roberto, Mettifogo, Elena, Timenetsky, Jorge, Kleven, Stanley y Ferreira, Antonio J. Piantino. 2009. Encuesta epidemiológica sobre Mycoplasma gallisepticum y M. synoviae mediante PCR multiplex en aves comerciales. Pesquisa Veterinária Brasileira, 29 (7), 552-556. https://doi.org/10.1590/S0100-736X2009000700009
6. Cerdá R. Medidas de prevención y control de la micoplasmosis en Latinoamérica. XX Congreso Latinoamericano de Avicultura; 2007. p. 111-124.
7. Charlton BR, Bermudez AJ, Boulianne M, Eckroade RJ, Jeffrey JS, Newman LJ, Sander JE, Wakenell PS. En: Charlton BR, editor. Manual de enfermedades aviarias. Kennett Square, Pensilvania, EE.UU.: Asociación Estadounidense de Patólogos Aviar; 1996. págs. 115-25.
8. Davidson W R, Nettles V F, Couvillion C E, Yoder H W., Jr Infectious sinusitis in wild turkeys. Avian Dis. 1982;26:402–405.
9. Evans JD, Leigh SA. Differentiation of Mycoplasma gallisepticum vaccine strains ts-11 and 6/85 from commonly used Mycoplasma gallisepticum challenge strains by PCR. Avian Dis. 2008 Sep;52(3):491-7. doi: 10.1637/8187-120307-ResNote.1. PMID: 18939641.
10. Feberwee A., Mekkes D., Wit J., E. G. Hartman, and A. Pijpers, "Comparison of culture, PCR, and different serologic tests for detection of Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae infections," 2005.Avian Diseases, vol. 49, no. 2, pp. 260–268.
11. Felice V, Lupini C, Mescolini G, Silveira F, Guerrini A, Catelli E, Di Francesco A. Detección molecular y caracterización de cepas de Mycoplasma gallisepticum y Mycoplasma synoviae en aves de corral en Italia. Poult Sci. Febrero de 2020; 99 (2): 719-724. doi: 10.1016 / j.psj.2019.12.020. Publicación electrónica del 24 de enero de 2020. PMID: 32029157; PMCID: PMC7587864.
12. Fraga AP, de Vargas T, Ikuta N, Fonseca AS, Celmer ÁJ, Marques EK, Lunge VR. A Multiplex real-time PCR for detection of Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae in clinical samples from Brazilian commercial poultry flocks. Braz J Microbiol. 2013 Oct 30;44(2):505-10.
13. Fujisawa, S., Murata, S., Takehara, M., Katakura, K., Hmoon, M. M., Win, S. Y., & Ohashi, K. 2019. Molecular detection and genetic characterization of Mycoplasma gallisepticum, Mycoplama synoviae, and infectious bronchitis virus in poultry in Myanmar. BMC veterinary research, 15(1), 261. https://doi.org/10.1186/s12917-019-2018-2
14. Gómez Rufo, D., García Sánchez, E., García Sánchez, J. E., & García Moro, M. 2021. Implicaciones clínicas de las especies del género Mycoplasma [Clinical implications of the genus Mycoplasma]. Revista espanola de quimioterapia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola de Quimioterapia, 34(3), 169–184. https://doi.org/10.37201/req/014.2021

15. Hammond PP, Ramírez AS, Morrow CJ, Bradbury JM. Development and evaluation of an improved diagnostic PCR for Mycoplasma synoviae using primers located in the haemagglutinin encoding gene vlhA and its value for strain typing. Vet Microbiol. 2009 Apr 14;136(1-2):61-8. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.10.011. Epub 2009 Nov 1. PMID: 19046834.
16. Hong Y, García M, Leiting V, Bencina D, Dufour-Zavala L, Zavala G, Kleven SH. Specific detection and typing of Mycoplasma synoviae strains in poultry with PCR and DNA sequence analysis targeting the hemagglutinin encoding gene vlhA. Avian Dis. 2004 Sep;48(3):606-16. doi: 10.1637/7156-011504R. PMID: 15529983.
17. Keiding Niels. Age-Specific Incidence and Prevalence: A Statistical Perspective. Journal of the Royal Statistical Society. Series A (Statistics in Society) 1991;154(3):371. doi: 10.2307/2983150.
18. Kojima A, Takahashi T, Kijima M, Ogikubo Y, Nishimura M, Nishimura S, Harasawa R, Tamura Y. Detection of Mycoplasma in avian live virus vaccines by polymerase chain reaction. Biologicals. 1997 Dec;25(4):365-71. doi: 10.1006/biol.1997.0108. PMID: 9467032.
19. Kursa O., Tomczykand G., Sawicka A. 2019. Prevalence and phylogenetic analysis of Mycoplasma synoviae strains isolated from Polish chicken layer flocks. J. Vet. Res. 63:41–49.
20. Landman WJ, Feberwee A. Longitudinal field study on the occurrence of Mycoplasma synoviae in Dutch turkey flocks with lameness and experimental induction of the condition. Avian Pathol. 2012;41(2):141-9. doi: 10.1080/03079457.2011.652595. PMID: 22515533.
21. Lauerman LH, Hoerr FJ, Sharpton AR, Shah SM, van Santen VL. Development and application of a polymerase chain reaction assay for Mycoplasma synoviae. Avian Dis. 1993 Jul-Sep;37(3):829-34. PMID: 7504919.
22. Messa Júnior, A., Taunde, P., Zandamela, A. F., Junior, A. P., Chilundo, A., Costa, R., & Bila, C. G. 2017. Serological Screening Suggests Extensive Presence of Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae in Backyard Chickens in Southern Mozambique. Journal of veterinary medicine, 2017, 2743187. https://doi.org/10.1155/2017/2743187
23. Metiifogo E., Buzinhani M., Buim M., Timenestsky J., Piantino A.Evaluation of a PCR multiplex for dtection and diferentiation of Mysoplasma synoviae, M. gallisepticum, and M. gallisepticum strain F-vaccine. 2015. Pesquisa Veterinaria, 35(1), 13-18.
24. Michiels T, Welby S, Vanrobaeys M, Quinet C, Rouffaer L, Lens L, Martel A, Butaye P. Prevalence of Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae in commercial poultry, racing pigeons and wild birds in Belgium. Avian Pathol. 2016;45(2):244-52. doi: 10.1080/03079457.2016.1145354. PMID: 26814376.
25. Nascimento E, Pereira VLA. Micoplasmoses. In: Berchieri Júnior A, Silva EN, Di Fábio J, Sesti L, Zuanaze MAF, editors. Doenças das Aves. 2.ed. Facta; Campinas: 2009. pp. 483–500.
26. Nascimento E., Yamamoto R., Herrick K., Tait R. Polymerase chain reaction for detection of Mycoplasma gallisepticum. Avian Dis. 1991 Jan-Mar;35(1):62-9. PMID: 2029263.
27. Noormohammadi AH. Role of phenotypic diversity in pathogenesis of avian mycoplasmosis. Avian Pathol. 2007 Dec;36(6):439-44. doi: 10.1080/03079450701687078. PMID: 17994321.
28. Papazisi L, Gorton TS, Kutish G, Markham PF, Browning GF, Nguyen DK, Swartzell S, Madan A, Mahairas G, Geary SJ. The complete genome sequence of the avian pathogen Mycoplasma gallisepticum strain R(low). Microbiology (Reading). 2003 Sep;149(Pt 9):2307-2316.
29. Pollack JD, Williams MV, McElhaney RN. T 1997. he comparative metabolism of the mollicutes (Mycoplasmas): the utility for taxonomic classification and the relationship of putative gene annotation and phylogeny to enzymatic function in the smallest free-living cells. Crit Rev Microbiol.;23(4):269-354. doi: 10.3109/10408419709115140. PMID: 9439886.
30. Potapov V, Ong JL. Examining Sources of Error in PCR by Single-Molecule Sequencing. PLoS One. 2017 Jan 6;12(1):e0169774. doi: 10.1371/journal.pone.0169774. Erratum in: PLoS One. 2017 Jul 6;12 (7):e0181128. PMID: 28060945; PMCID: PMC5218489.
31. Raviv Z., Ley D. Mycoplasma gallisepticum infection D.E. Swayne, J.R. Glisson, L.R. McDougald, L.K. Nolan, D.L. Suarez, N. Venugopal (Eds.), Disease of Poultry (13th edn.), Iowa State Press, Ames (2013), pp. 877-893.
32. SENASA [Internet]. REPORTE EPIDEMIOLOGICO - SEMANA 47. 2020 [citado 7 julio 2021]. Disponible en: https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2020/12/REPORTE-SEMANA-47.pdf.
33. Warburg O, Christian W. 1942. Isolation and crystallization of enolase. Biochem Z 310:384–421