

Diagnóstico laboratorial de dos casos de amiloidosis en pollitas rubias.

M. BIARNÉS ^{1*}, A. BLANCO ¹, Q. CAMPRUBÍ ¹, N. CANALS ¹ y R. PORTA ¹

¹ Centre de Sanitat Avícola de Catalunya i Aragó (CESAC), 43206 Reus, Tarragona, España.
e-mail: mbiarnes@cesac.org

RESUMEN

La amiloidosis es un desorden patológico que se caracteriza por el depósito de un material amiloide de naturaleza proteica, insoluble, en los espacios extracelulares de diversos órganos y tejidos ocasionando alteraciones funcionales y estructurales según la localización e intensidad del depósito. Está descrito por varios autores que las ponedoras rubias son especialmente susceptibles a padecer artropatía amiloide asociada a *Mycoplasma synoviae* (MS) y/o *Enterococcus faecalis* (EF), entre otras causas. En este estudio se describen dos casos de amiloidosis en pollitas rubias, desde los signos clínicos y lesiones macroscópicas, hasta las técnicas de laboratorio utilizadas para el diagnóstico que fueron: Aislamiento e Identificación Bacteriana, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) e Inhibición de la Hemaglutinación (IH).

Palabras clave: Amiloidosis; *Mycoplasma synoviae*; PCR; Inhibición Hemaglutinación.

Laboratory Diagnosis of two outbreaks of amyloidosis in brown layers.

SUMMARY

Amyloidosis is a pathologic disorder characterized by deposition of proteinaceous, amyloid material in the extracellular spaces of different organs and tissues causing functional and structural changes depending on the location and intensity of the deposit. It is well reported that brown layers are particularly susceptible to amyloid arthropathy caused by *Mycoplasma synoviae* (MS) and/or *Enterococcus faecalis* (EF), among other causes. In this study two outbreaks of amyloidosis in brown layers are described, from clinical signs and gross lesions to the used laboratory techniques for diagnosis that were: Bacterial Isolation and Identification, Polymerase Chain Reaction (PCR) and Hemagglutination Inhibition test (IH).

Keywords: Amyloidosis; *Mycoplasma synoviae*; PCR; Hemagglutination Inhibition Test.

Introducción

Mycoplasma synoviae (MS) es un patógeno reconocido tanto de los pollos como de los pavos. En muchas ocasiones provoca una infección de vías respiratorias altas subclínica, pero en otros muchos casos se asocia a sinovitis y problemas respiratorios causando importantes pérdidas económicas. (Kleven *et al*, 2008)

La artropatía amiloide se caracteriza por el depósito de un material amiloide de naturaleza proteica, insoluble y de color amarillo-naranja, causando problemas locomotores. Las ponedoras rubias son especialmente susceptibles a padecerlo y las causas más comunes asociadas a este proceso son *Mycoplasma synoviae* (MS) y/o *Enterococcus faecalis* (EF), entre otras causas. (Landman *et al*, 1999, 2001)

MS tiene la capacidad de hemaglutinar los glóbulos rojos de las aves, es por ello, que para detectar anticuerpos frente la Hemaglutinina (HA) de MS se utiliza, entre otras, la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación.

El aislamiento e identificación de *Mycoplasma* es una técnica que requiere mucho tiempo y experiencia, es por ello que para un diagnóstico etiológico rápido y fiable se utilizan técnicas como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

A principios de este año recibimos en el CESAC cuatro casos de amiloidosis en pollitas rubias. En este estudio describimos dos de ellos y cuales fueron los resultados de las técnicas de laboratorio utilizadas para su diagnóstico.

Material y métodos

Muestras

Los análisis se realizaron a partir de muestras procedentes de los dos casos clínicos que en este trabajo se describen y que fueron tomadas en el departamento de necropsias del CESAC durante el estudio *postmortem*.

Las muestras recogidas en el caso 500/2010 fueron: hisopos articulares, hisopos de vías respiratorias altas y sangre para la obtención de suero. En el caso 1298/2010 se tomaron hisopos articulares y de vías respiratorias altas.

PCR

A partir de hisopos articulares y de vías respiratorias altas se realizó la extracción del ADN con el kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. La PCR de MS utilizada fue la descrita por Lauerman *et al*, 1993, que amplifica parcialmente la secuencia del rRNA 16S. El producto de la PCR para MS es de 214pb y se detecta en electroforesis convencional en gel de agarosa.

Cultivo bacteriológico

A partir de los hisopos articulares se realizó una siembra directa en medio agar sangre (DIFCO, 770103) agar MacConkey (DIFCO, 212123) y agar verde brillante (DIFCO, 228530), se incubaron a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ en atmósfera aerobia durante $24\pm 3\text{h}$. Seguidamente los hisopos se sembraron en caldo corazón cerebro (BD, 237500) y se incubó a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ en atmósfera aerobia durante $(24\pm 3\text{h})\times 2$, después de 24 y 48 horas de incubación se repitió la siembra en agar utilizando los tres medios anteriores. Tras los tiempos de incubación las placas fueron examinadas.

Serología

Para la detección de anticuerpos frente MS, se llevó a cabo el test de la Inhibición de la Hemaglutinación (IH). Se utilizó un antígeno preparado a partir de un cultivo fresco de MS el cual se tituló y estandarizó a cuatro unidades hemaglutinantes (4UH). Se realizó una dilución seriada a partir de 25ul de cada suero, desde 1:2 hasta 1:256, en solución tampón fosfato salino (PBS), también se analizaron por duplicado un suero control positivo y uno negativo. Se añadió el antígeno a 4UHA a los sueros diluidos, se incubó y posteriormente se añadió una suspensión en PBS de glóbulos rojos de gallina al 0,5%. Se consideró que un suero era positivo cuando mostraba un 100% de inhibición de la hemaglutinación a dilución 1/8 o mayor. (Feberwee *et al*, 2005, Kleven *et al*, 2000)

Resultados y discusión

Signos clínicos y lesiones macroscópicas

Caso 500/2010: Recibimos 7 pollitas de 13 semanas de vida, procedentes de un lote de 70.000 con problemas locomotores, cojeras, postración y falta de peso. La morbilidad fue de un 25% mientras que la tasa de mortalidad fue insignificante. En la necropsia se observó artritis bilateral a nivel de las articulaciones de las extremidades posteriores con cúmulo de material amiloide de color amarillo-naranja y exudado transparente de consistencia viscosa. Bursitis esternal. Hepatomegalia y esplenomegalia.

Figura 1. Detalle de la lesión a nivel de la articulación de la rodilla, caso 500/2010.



Figura 2. Detalle de la lesión a nivel de la articulación tibio-tarsiana, caso 500/2010.



Caso 1298/2010: Recibimos 4 pollitas de 15 semanas de vida, procedentes de un lote 125.000 con problemas locomotores, cojeras, postración y falta de peso. La morbilidad fue de un 5% mientras que la tasa de mortalidad fue insignificante. En la necropsia se observó artritis bilateral a nivel de las articulaciones de las extremidades posteriores con cúmulo de material amiloide de color amarillo-naranja y exudado transparente de consistencia viscosa. Bursitis esternal.

Figura 3. Detalle de la lesión a nivel plantar, caso 1298/2010.



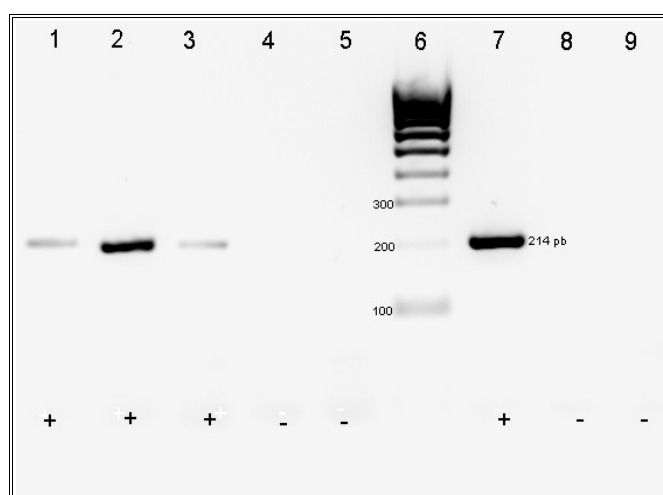
Figura 4. Detalle de la lesión a nivel de la articulación tibio-tarsiana, caso 1298/2010.



PCR MS

En los dos casos clínicos que se presentan los resultados de la PCR de MS fueron iguales, resultando positivas tanto las muestras de hisopos articulares como los hisopos de vías respiratorias altas. En la electroforesis convencional en gel de agarosa, se aprecia como el producto amplificado de hisopos de vías respiratorias altas obtiene una señal más fuerte que el producto de hisopos articulares. En la Figura 1 se representa los resultados de la PCR MS del caso 500/2010, carriles 1: hisopos articulares; 2: hisopos de vías respiratorias altas; 6: marcador de peso molecular; 7: control positivo MS; 8 y 9 controles negativos, el resto de carriles pertenecen a otras muestras.

Figura 1. Resultados de PCR MS caso 500/2010



Cultivo bacteriológico

En ninguno de los dos casos se observó crecimiento bacteriano.

Serología

Caso 500/2010. Se analizaron un total de 7 sueros, el título de IH de todos ellos fue superior a 1/8 o lo que es lo mismo, 3 (dilución 1/8, $\log_2 8 = 3$). En la siguiente tabla se detalla los títulos de IH de todos los sueros testados y la media aritmética de todos ellos.

Tabla 1. Resultados IH MS caso 500/2010.

| Dilución | 0 | 1 (1/2) | 2 (1/4) | 3 (1/8) | 4 (1/16) | 5 (1/32) | 6 (1/64) | 7 (1/128) | 8 (1/256) | Media a. |
|----------|---|---------|---------|---------|----------|----------|----------|-----------|-----------|----------|
| Sueros | | | | | 1 | 3 | 1 | 1 | | 5,33 |

Diagnóstico Laboratorial

Con el estudio bacteriológico se descartó como causa cualquier bacteria que pueda aislarse bajo las condiciones descritas, entre ellas *Enterococcus faecalis*. Tanto el diagnóstico serológico mediante la IH, como el diagnóstico etiológico mediante la PCR MS apuntan a *Mycoplasma synoviae* como la causa probable de estos dos casos de amiloidosis.

En muchas ocasiones las infecciones por MS cursan de forma subclínica, sin embargo en los dos casos descritos, ya que la patología ha sido relevante, consideramos fundamental la caracterización de dichas cepas de MS para comprobar si existen en campo cepas de MS con diferente patotipo.

Referencias

- FEBERWEE, A., MEKKES, D.R., de WIT, J.J., HARTMAN, E.G. y PIJPERS, A.** (2005). Comparison of culture, PCR, and different serologic test for detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* infections. *Avian Diseases* **49** : 260-268
- KLEVEN, S.H. y FERGUSON-NOEL, N.** (2008). *Mycoplasma synoviae* infection. *Diseases of Poultry*. 12th, Saif, Y.M. . Blackwell Publishing, Iowa, EEUU : 845-862.
- KLEVEN, S.H., JORDAN, F.T.W. y BRADBURY, J.M.** (2000). Manual of standards for diagnostic test and vaccines, avian mycoplasmosis. Office International des Epizooties, Paris, France. pp. 666-678.
- LANDMAN, W.J.M. y FEBERWEE, A.** (2001). Field studies on the association between amyloid arthropathy and *Mycoplasma synoviae* infection, and experimental reproduction of the condition in brown layers. *Avian Pathology*: **30**, 629-639.
- LANDMAN, W.J.M., MEKKES, D.R., CHAMANZA, R., DOORNENBAL, P. y GRUYS, E.** (1999). Arthropathic and amyloidogenic *Enterococcus faecalis* infections in brown layers: study on infection routes. *Avian Pathology*: **28**: 545-557.
- LAUERMAN, L.H., HOERR, F.J., SHARPTON, A.R., SHAH, S.M. y VAN SANTEN, V.L.** (1993) Development and application of a Polymerase Chain Reaction assay for *Mycoplasma synoviae*. *Avian Diseases* **37**: 829-834.