



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Genotipificación y mutaciones
asociadas a resistencia
antimicrobiana en cepas de
Mycoplasma gallisepticum y
M. synoviae en aves comerciales de
Colombia**

Sara Judith Forero Marín

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia
Departamento Ciencias para la Salud Animal
Bogotá D.C., Colombia
2025

Genotipificación y mutaciones asociadas a resistencia antimicrobiana en cepas de *Mycoplasma gallisepticum* y *M. synoviae* en aves comerciales de Colombia

Sara Judith Forero Marín

Tesis o trabajo de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Salud Animal

Directora:

MV, MSc, PhD. Gloria Consuelo Ramírez Nieto

Codirectora:

MV, PhD. Arlen Patricia Gómez Ramírez

Línea de Investigación:

Microbiología e inmunología

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia
Departamento Ciencias para la Salud animal
Bogotá D.C., Colombia
2025

Declaración de obra original

Yo Sara Judith Forero Marín, declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Sara Judith Forero Marín

Fecha: 21 de abril de 2025

A mis padres, por su amor incondicional y por ser el faro constante en este viaje. A mis amigos, por su compañía sincera a lo largo del camino. A mis tutoras, por su guía generosa, su experiencia compartida y por enseñarme a mirar más allá.

“Caminando en línea recta no puede uno llegar muy lejos.”

El Principito de Antoine de Saint-Exupéry

Agradecimientos

Esta maestría ha sido una etapa de grandes aprendizajes, desafíos y crecimiento personal. Cada paso en este proceso ha estado acompañado de personas y experiencias que dejaron una huella profunda en mi vida, y es a ellas a quienes deseo dedicar estas palabras. A la Universidad Nacional de Colombia y, en especial, a la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, por brindarme no solo una formación académica de excelencia, sino también por enseñarme a crecer de manera integral: en lo profesional, lo deportivo y lo personal.

A mi mamá, Aydée Marín Pallares, por ser esa fuerza inquebrantable que con su amor, palabras y ejemplo me motivó a iniciar, continuar y culminar este viaje lleno de aprendizajes científicos y de la vida. A mi papá, Luis Forero Cortés, por su apoyo constante y presencia en cada etapa de mi vida. A mis hermanos, Iván y Raúl, por estar siempre a mi lado, en cada momento importante. A los que me acompañan desde el cielo por su enseñanzas en vida y su protección.

A mi directora, la doctora Gloria Consuelo Ramírez Nieto, gracias por creer en mí y en este proyecto, por su guía, su confianza y su acompañamiento constante. A mi codirectora, la doctora Arlen Patricia Gómez Ramírez, quien ha sido una inspiración y un apoyo desde mis días de pregrado; gracias por sus enseñanzas, su cercanía y por motivarme a seguir adelante.

A Magda Beltrán, por sus sabios consejos dentro y fuera del laboratorio, por su generosidad al compartir su tiempo y conocimiento. A Camila Daza, por su apoyo incondicional, sus palabras de aliento y por ser un abrazo en los momentos difíciles. A Hader Díaz, por creer en mí y estar presente en cada decisión importante. A Santiago Escobar, por ser no solo un compañero de laboratorio, sino también un verdadero amigo. A Karen Rodríguez, por su compañía y valiosa amistad. A Andrés Ospina, por compartir su experiencia y saber con generosidad.

A todas las personas del Laboratorio de Patología Aviar, a Juan Miguel y la doctora Diana Álvarez por sus aportes en este proyecto.

Finalmente, al Laboratorio de Biología Molecular y Virología, por ser un espacio de crecimiento, aprendizaje y encuentro, que ha sido fundamental en mi desarrollo personal y profesional a lo largo de este proceso.

Finalizar esta etapa académica no habría sido posible sin el respaldo, la guía y el afecto de quienes me acompañaron en este recorrido. A todos ellos, les expreso mi más profundo agradecimiento.

Resumen

Genotipificación y mutaciones asociadas a resistencia antimicrobiana en cepas de *Mycoplasma gallisepticum* y *M. synoviae* en aves comerciales de Colombia

La micoplasmosis aviar, causada por *Mycoplasma gallisepticum* (Mg) y *Mycoplasma synoviae* (Ms), afecta principalmente a aves reproductoras y ponedoras comerciales, y en menor medida a pollos de engorde, ocasionando cuadros clínicos respiratorios, reproductivos y sinovitis infecciosa de curso crónico. El diagnóstico y control de esta enfermedad se han visto complicados por la variación antigénica del patógeno. A pesar de su alta prevalencia y de la existencia de estrategias de prevención y control, para que estas sean efectivas es necesario identificar y caracterizar molecularmente las especies circulantes en el país. En este contexto, el objetivo de este estudio fue caracterizar genotipos y mutaciones asociadas con resistencia a antimicrobianos de *Mycoplasma gallisepticum* y *M. synoviae* en aves comerciales de Colombia. A partir de pooles muestras de aves comerciales provenientes de diferentes departamentos recolectadas entre 2019 y 2023, por medio del servicio de diagnóstico del Laboratorio de Biología Molecular y Virología, se analizaron 90 pooles de muestras clasificadas como Mg, Ms y detecciones simultáneas de Mg-Ms. A partir de genes *housekeeping* previamente reportados para ambas especies, se identificaron las muestras con perfiles alélicos completos mediante PCR convencional, seguida de secuenciación y análisis bioinformático. Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos PubMLST para asignar los respectivos alelos y establecer el perfil alélico de cada cepa. Como resultado, se obtuvieron 10 perfiles alélicos en las detecciones Mg, 11 en Ms y 15 en Mg-Ms. En el caso de Mg, el 70 % correspondió a una ST vacunal, mientras que el 30 % restante representó nuevas ST no reportadas previamente. Para Ms, más del 90 % de los perfiles correspondieron a nuevas ST tampoco reportadas anteriormente, mientras que dos muestras se relacionaron con aislados de Europa. Adicionalmente, se identificaron 14 ST con genotipos asociados a resistencia a fluoroquinolonas, con mutaciones en las regiones QRDR de los genes *gyrA* y *parC*, lo que evidencia la circulación de genotipos resistentes en cepas de campo. Estos hallazgos resaltan la necesidad de relacionar los genotipos identificados con los cuadros clínicos, el tipo de unidad avícola y su procedencia, para comprender mejor la epidemiología de la enfermedad en Colombia bajo el enfoque de Una Salud. Este estudio constituye la primera caracterización de micoplasmas aviares en el país mediante MLST, junto con la identificación de genotipos asociados a resistencia a los antimicrobianos (RAM).

Palabras clave: *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, MLST, RAM, genotipificación

Abstract

Genotyping and Antimicrobial Resistance-Associated Mutations in *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* Strains from Commercial Poultry in Colombia

Avian mycoplasmosis, caused by *Mycoplasma gallisepticum* (Mg) and *Mycoplasma synoviae* (Ms), mainly affect commercial breeding and laying birds, and to a lesser extent broiler chickens, causing respiratory and reproductive clinical symptoms and chronic infectious synovitis. The diagnosis and control of this disease have been complicated by the antigenic variation of the pathogen. Despite its high prevalence and the existence of prevention and control strategies, for these to be effective it is necessary to identify and molecularly characterize the species circulating in the country. In this context, the objective of this study was to characterize genotypes and mutations associated with antimicrobial resistance of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* in commercial poultry in Colombia. From pools of commercial poultry samples from different departments collected between 2019 and 2023, 90 pools of samples classified as Mg, Ms, and simultaneous detections of Mg-Ms were analyzed using the diagnostic service of the Molecular Biology and Virology Laboratory. Based on previously reported housekeeping genes for both species, samples with complete allelic profiles were identified using conventional PCR, followed by sequencing and bioinformatic analysis. The sequences obtained were compared with the PubMLST database to assign the respective alleles and establish the allelic profile of each strain. As a result, 10 allelic profiles were obtained in Mg detections, 11 in Ms, and 15 in Mg-Ms. In the case of Mg, 70% corresponded to a vaccine ST, while the remaining 30% represented new STs not previously reported. For Ms, more than 90% of the profiles corresponded to new STs that had not been previously reported, while two samples were related to isolates from Europe. In addition, 14 STs with genotypes associated with fluoroquinolone resistance were identified, with mutations in the QRDR regions of the *gyrA* and *parC* genes, which show the circulation of resistant genotypes in field strains. These findings highlight the need to link the identified genotypes with clinical pictures, the type of poultry unit, and its origin to better understand the epidemiology of the disease in Colombia under the One Health approach. This study constitutes the first characterization of avian mycoplasmas in the country using MLST, together with the identification of genotypes associated with antimicrobial resistance (AMR).

Keywords: *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, MLST, AMR, genotyping

Contenido

	Pág.
Resumen	VII
Lista de Figuras	XI
Lista de Tablas	XII
Lista de abreviaturas	XIII
Introducción	1
1. Micoplasmosis aviar y su impacto en la salud de aves comerciales	4
1.1 Cuadro clínico de Micoplasmosis aviar	6
1.2 Aspectos relevantes del genoma de los micoplasmas	8
1.3 Variación antigénica en los micoplasmas	9
1.4 Diagnóstico	12
1.5 Control de la enfermedad	13
1.5.1 Antimicrobianos	13
1.5.2 Vacunas disponibles para micoplasma aviar	14
2. Nuevos perfiles alélicos en cepas colombianas de <i>Mycoplasma</i> spp. identificados mediante MLST	16
2.1 Introducción	16
2.2 Materiales y métodos	20
2.2.1 Origen y Selección de muestras	20
2.2.2 Extracción de ADN y Selección de muestras	20
2.2.3 Esquema MLST para <i>Mycoplasma gallisepticum</i> y <i>M. synoviae</i>	22
2.2.4 Construcción de árboles filogenéticos a partir de MLST	24
2.3 Resultados	25
2.3.1 <i>M. gallisepticum</i> y <i>M. Synoviae</i> fueron detectados mediante amplificación por PCR convencional de <i>mgc2</i> y <i>vlhA</i>	25
2.3.2 El mayor porcentaje de muestras disponibles para análisis provino de aves reproductoras y del departamento de Santander	25
2.3.3 Se evidenció por primera vez un esquema MLST de Mg en Colombia con un perfil alélico único que no había sido reportado previamente	30
2.3.4 El esquema MLST de detecciones de <i>M. Synoviae</i> permitió evidenciar la existencia de ST únicas	31
2.3.5 Se encontraron diferentes resultados en esquema MLST de muestras con detección simultánea de <i>M. gallisepticum</i> y <i>M. synoviae</i>	33
2.3.6 Árboles filogenéticos de Mg y Ms	35

X Genotipificación y mutaciones asociadas a resistencia antimicrobiana en cepas de *Mycoplasma gallisepticum* y *M. synoviae* en aves comerciales de Colombia

2.4	Discusión	40
3.	Capítulo 3: Circulación de genotipos de RAM en micoplasmas aviaries en Colombia.....	46
3.1	Introducción	46
3.2	Materiales y métodos	48
3.3	Resultados.....	50
3.3.1	Detección de genes asociados con resistencia a fluoroquinolonas	50
3.3.2	Análisis bioinformático de detecciones de genotipos de RAM	52
3.4	Discusión	55
4.	Conclusiones y recomendaciones	59
4.1	Conclusiones	59
4.2	Recomendaciones	60
5.	Bibliografía	62
6.	Anexos.....	74
A.	Comité de bioética	74
B.	Proyecto ganador del concurso Fondo de Apoyo a la Investigación: Dr. Pedro Villegas Narváez de AMEVEA 2023	75
C.	Participación como ponente en ENICIP 2023	76
D.	Participación en el Congreso XXI de FENAVI 2024	77
E.	Participación en PANVET 2024 en Montevideo, Uruguay	78

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1-1 Lesiones macro de Micoplasmosis aviar causada por <i>M. gallisepticum</i> y <i>M. synoviae</i>	7
Figura 1-2. Esquema de la recombinación unidireccional de la región conservada y regiones variables del gen <i>vlhA</i> de <i>M. synoviae</i>	11
Figura 1-3. Gel de electroforesis con las cepas vacunales de <i>M. gallisepticum</i> y <i>M. Synoviae</i>	12
Figura 2-1. Amplificación de genes <i>mgc2</i> y <i>vlhA</i> para <i>M. gallisepticum</i> y <i>M. Synoviae</i>	25
Figura 2-2: Esquema MLST para Mg. La Figura muestra las detecciones de cada uno de los genes en geles de electroforesis.....	30
Figura 2-3 Esquema MLST para Ms. La Figura muestra las detecciones de cada uno de los genes en geles de electroforesis.....	32
Figura 2-4. Árboles filogenéticos de <i>Mycoplasma gallisepticum</i>	37
Figura 2-5. Árboles filogenéticos de <i>Mycoplasma synoviae</i>	39
Figura 3-1. Detecciones de los genes <i>gyrA</i> y <i>parC</i> de muestras con esquema completo MLST de M.....	51
Figura 3-2. Detecciones de los genes <i>gyrA</i> y <i>parC</i> de muestras con esquema completo MLST de Ms.....	51
Figura 3-3. Mutaciones asociadas a <i>gyrA</i> en <i>M. gallisepticum</i>	52
Figura 3-4. Mutaciones en <i>parC</i> asociadas a RAM en <i>M. gallisepticum</i>	53
Figura 3-5. Mutaciones asociadas a <i>gyrA</i> en <i>M. synoviae</i>	53
Figura 3-6 Mutaciones en <i>parC</i> asociadas a RAM en <i>M. synoviae</i>	54

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1-1. Información del genoma de <i>Mycoplasma gallisepticum</i> y <i>Mycoplasma synoviae</i>	8
Tabla 2-1. Genes <i>housekeeping</i> del esquema MLST de <i>M. gallisepticum</i>	19
Tabla 2-2. Genes <i>housekeeping</i> del esquema MLST de <i>M. synoviae</i>	19
Tabla 2-3. Primers para la identificación de <i>M. gallisepticum</i> y <i>M. synoviae</i> mediante PCR convencional.	21
Tabla 2-4. Mezclas estandarizadas para los genes del esquema MLST de <i>M. synoviae</i>	22
Tabla 2-5 Primers utilizados para los esquemas MLST para Mg y Ms.	23
Tabla 2-6. Muestras de detección de <i>M. gallisepticum</i> seleccionadas para realizar esquema MLST.....	26
Tabla 2-7. Muestras con detección de <i>M. synoviae</i> seleccionadas para realizar esquema MLST.....	28
Tabla 2-8. Muestras con detección de <i>M. gallisepticum</i> y <i>M. synoviae</i> seleccionadas para realizar esquema MLST.....	29
Tabla 2-9. Perfiles alélicos y ST obtenidos del MLST de <i>Mycoplasma gallisepticum</i>	31
Tabla 2-10. Perfiles alélicos y ST obtenidos del MLST de <i>Mycoplasma synoviae</i>	33
Tabla 2-11. Perfiles alélicos y ST obtenidos del MLST de <i>Mycoplasma gallisepticum</i> de muestras con detecciones Mg-Ms.....	34
Tabla 2-12. Perfiles alélicos y ST obtenidos del MLST de <i>Mycoplasma synoviae</i> de muestras con detecciones Mg-Ms.....	34
Tabla 3-1: Primers usados en la detección de genotipos de resistencia para <i>gyrA</i> y <i>parC</i> en detecciones de Mg y Ms.....	49
Tabla 3-2 Cambios en aminoácidos en los genes <i>gyrA</i> y <i>parC</i> de <i>Mycoplasma gallisepticum</i> y <i>M. synoviae</i>	54

Lista de abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
AA	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
Ala	Alanina
AMR	Antimicrobial resistance
Arg	Arginina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN transferencia
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
ATP	Adenosín trifosfato
EF-G	Factor de Elongación G
ERC	Enfermedad Respiratoria Crónica
GTS	Secuenciación dirigida de genes
HO	Hisopo de órganos
HSA	Hisopos de sacos aéreos
HSAA	Hisopos de sacos aéreos abdominales
HT	Hisopo traqueal
Hys	Histidina
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
μ L	Microlitro
Mg	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>
Mi	<i>Mycoplasma iowae</i>
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria
MLST	Tipificación de secuencias multilocus
Mm	<i>Mycoplasma meleagridis</i>
Ms	<i>Mycoplasma synoviae</i>

XIV Genotipificación y mutaciones asociadas a resistencia antimicrobiana en cepas de *Mycoplasma gallisepticum* y *M. synoviae* en aves comerciales de Colombia

Abreviatura	Término
<i>ND</i>	No determinada
<i>NER ABC</i>	Nucleotide Excision Repair ABC
<i>ng</i>	Nanogramos
<i>OMSA</i>	Organización Mundial de Sanidad Animal
<i>ORF</i>	Marco de lectura abierto
<i>Pb</i>	Pares de bases
<i>PCR</i>	Polymerase chain reaction
<i>Pibs</i>	Pollitos picados no nacidos
<i>POE</i>	Procedimientos operativos estándar
<i>Pro</i>	Prolina
<i>PRR</i>	Repeticiones en tandem ricas en prolina
<i>QRDR</i>	Regiones determinantes de la resistencia a quinolonas
<i>RAM</i>	Resistencia Antimicrobiana
<i>RIII</i>	Regiones altamente polimórficas
<i>Ser</i>	Serina
<i>ST</i>	Secuencia tipo
<i>Thr</i>	Treonina
<i>Trp</i>	Triptófano
<i>Tyr</i>	Tirosina
<i>UNAL</i>	Universidad Nacional de Colombia
<i>Vf</i>	Volumen final

Introducción

Los micoplasmas aviáres se encuentran dentro de los 25 patógenos de mayor preocupación que reporta la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA), debido a que generan afectaciones en la salud de aves de corral que se reflejan en efectos económicos negativos y por consiguiente, generan un impacto en los sistemas productivos de los países. Las especies más relevantes son: *Mycoplasma gallisepticum* (Mg), *M. synoviae* (Ms), *M. meleagridis* (Mm) y *M. iowae* (Mi) (Ferguson-Noel, 2013; Nascimento et al., 2005; OMSA, 2021). El tropismo tisular de este microorganismo varía de acuerdo con las especies y los hospedadores, afectando el sistema respiratorio, las articulaciones, el tracto reproductivo y generando defectos en la cáscara de los huevos (Ferguson-Noel, 2013; Nascimento et al., 2005), de esta manera, ocasiona una disminución de los parámetros productivos, afecta la viabilidad de lotes y aumenta las penalizaciones en canal (OMSA, 2021). Además, se relaciona con la presentación de la Enfermedad Respiratoria Crónica (ERC), en primer lugar, porque tiene la capacidad de evadir el sistema inmune (Nascimento et al., 2005) y en segundo lugar, al causar una inmunosupresión transitoria favorece la entrada de otros agentes infecciosos tanto virales como bacterianos como los que ocasionan la Enfermedad de Newcastle, la Bronquitis infecciosa aviar, la Laringotraqueitis aviar y/o Colibacilosis, y es en ese momento que los síntomas clínicos se hacen evidentes (Kleven, 1998; Michiels et al., 2016; Nascimento et al., 2005). Sin embargo, las infecciones crónicas y asintomáticas son consideradas las de mayor importancia debido a que pueden no ser diagnosticadas oportunamente, causando efectos adversos en la salud y producción de las aves resultando en pérdidas económicas (Nascimento et al., 2005). En términos económicos, Mg y Ms son considerados los más importantes, resaltando que tienen una distribución mundial (OMSA, 2021), por lo que un diagnóstico preciso y rápido es importante para el control de la diseminación de la enfermedad (Galluzzo et al., 2022; Salih et al., 2020). Dentro de las estrategias para el diagnóstico, el cultivo y aislamiento del patógeno se considera la prueba de referencia; sin embargo, debido al tiempo y las condiciones específicas y meticulosas que requieren los

micoplasmas para su crecimiento, resulta difícil y, por lo tanto, se han establecido otras alternativas para este fin principalmente enfocadas a la detección molecular de este agente (Galluzzo et al., 2022).

En Colombia, el diagnóstico de rutina se basa en técnicas serológicas como la de Aglutinación Rápida en Placa utilizada como prueba tamiz la cual, en caso de arrojar resultados positivos, estos deben ser confirmados mediante el método de Inhibición de la Hemaglutinación; como método intermedio entre las dos pruebas mencionadas anteriormente se encuentra la ELISA (Bustos et al., 1988; Carrión et al., 2012; OMSA, 2021).

A pesar de la importancia de esta enfermedad, los estudios sobre *Mycoplasma aviar* en el país son limitados. Un estudio realizado por Ventura et al., (2012), permitió la detección y diferenciación por PCR de Mg y Ms y determinó una alta prevalencia de Mg y Ms en el país. Aunque estos resultados son importantes, y teniendo en cuenta la utilización de vacunas vivas como método de prevención y control, además de la detección es necesario diferenciar entre cepas vacunales y de campo, con el fin de aportar el diagnóstico y orientar las medidas de control en el país. Adicionalmente, es importante resaltar que debido a las características del genoma de Mg y Ms se han reportado variantes genéticas con antigenicidad, patogenicidad y transmisibilidad con diferencias muy marcadas entre ellas, permitiendo el establecimiento de genotipos con una distribución geográfica específica, lo cual muestra la necesidad de implementar metodologías moleculares que permitan la caracterización de los Micoplasmas considerando aspectos inherentes a los sistemas de producción y condiciones geográficas propias de nuestro país. (Armour et al., 2013; Kreizinger et al., 2018).

En términos generales, en Colombia se realiza la vacunación principalmente para *M. gallisepticum* con vacunas vivas atenuadas; sin embargo, el uso de estas no garantiza un 100% de protección contra la enfermedad y debe ser parte de un programa integral de control. Los productos disponibles contienen la Cepa F, Cepa 6/85 y ts-11 (Carrión et al., 2012), cuyo objetivo es desplazar a las cepas de campo y tratar que se establezcan las cepas vacunales en las producciones avícolas (Ventura et al., 2012). Igualmente, para poder determinar esto es necesario hacer uso de las técnicas moleculares, aprovechando su poder discriminatorio para identificar qué agente es el que está circulando. Por otro lado,

vale la pena mencionar que en los últimos años se ha empleado la vacuna MS-H, la cual previene el desarrollo de los signos clínicos y por consiguiente las pérdidas económicas que estos puedan generar (Omotainse et al., 2022).

De igual manera es importante reconocer que en los micoplasmas existe la problemática de la resistencia a antimicrobianos (RAM). Debido a que el diagnóstico por aislamiento es difícil, el uso indiscriminado de antibióticos para su control y tratamiento es común por la baja disponibilidad de pruebas de fenotipo de susceptibilidad antibiótica en los laboratorios veterinarios (Gautier-Bouchardon, 2018). Si bien el uso de antibióticos ayuda a disminuir los signos clínicos, reducir pérdidas económicas y es una de las estrategias de control, no es una opción única para su uso a largo plazo (Bekő et al., 2020; Limsatanun et al., 2022a). Como consecuencia de este uso prolongado, se han identificado genotipos de RAM, en donde se destacan los asociados a fluoroquinolonas ya que, junto a los macrólidos son los antibióticos que más se utilizan en la avicultura (Gerchman et al., 2011; Roth et al., 2019). De esta manera, la caracterización molecular de las regiones determinantes de la resistencia a quinolonas (QRDRs) en la ADN girasa y la topoisomerasa IV, específicamente de los genes *gyrA* y *parC*, se postula como un método preliminar de tamizaje rápido para determinar la susceptibilidad de las cepas de campo a fluoroquinolonas (Lysnyansky et al., 2012).

Con base en lo anterior el objetivo general de este estudio fue caracterizar genotipos y mutaciones asociadas con resistencia a antimicrobianos de *Mycoplasma gallisepticum* y *M. synoviae* en aves comerciales de Colombia. Teniendo en cuenta como objetivos específicos: 1) Aportar al diagnóstico de la Micoplasmosis aviar en Colombia mediante la caracterización de genotipos a partir de pools de muestras detectados como Mg y/o Ms, provenientes del servicio de diagnóstico. 2) Determinar la variabilidad genética de cepas de Mg y Ms que circulan en granjas avícolas de Colombia mediante la identificación de los genotipos presentes. 3) Identificar los genes y sus mutaciones asociadas con la resistencia a fluoroquinolonas en detecciones moleculares de Mg y Ms obtenidas de granjas avícolas. 4) Determinar la frecuencia de presentación de las mutaciones puntuales de nucleótidos o genes diana, que pueden estar relacionados con la resistencia a fluoroquinolonas.

1. Micoplasmosis aviar y su impacto en la salud de aves comerciales

Micoplasmosis aviar es una enfermedad bacteriana ocasionada por *Mycoplasma*. Taxonómicamente, el género *Mycoplasma* pertenece a la clase *Mollicutes*, orden Mycoplasmatales y familia Mycoplasmataceae. Estos microorganismos se caracterizan por no tener pared celular, conservando el mínimo de organelas necesarias para sobrevivir: una membrana plasmática, ribosomas y un genoma pequeño como resultado de una evolución degenerativa (Ferguson-Noel, 2013; Razin, 1992; Razin et al., 1998). Este proceso consiste en la pérdida de genes involucrados en el metabolismo, la producción de energía, la regulación de la transcripción, la división celular y la respuesta al choque térmico. No obstante, han conservado el sistema esencial de síntesis de proteínas, llevando una o dos copias del gen del ARNr y un reducido número de genes de ARNt (Razin, 1992).

Debido a la reducción del genoma, los micoplasmas se pueden considerar como “parásitos” obligados que requieren de condiciones nutricionales específicas como la disponibilidad de ácidos grasos, colesterol y vitaminas por parte de los hospederos; de hecho, *M. gallisepticum* requiere de fosfolípidos preformados para su crecimiento (Razin, 1992; Razin et al., 1998). Adicionalmente, la adhesión de los micoplasmas patógenos a su tejido diana es esencial para la colonización por lo que han desarrollado unas proteínas llamadas adhesinas y han modificado antígenos de superficie que contribuyen al alto grado de interdependencia entre la bacteria y el hospedero, exhibiendo especificidad de órganos y tejidos (Ferguson-Noel, 2013; Levisohn & Kleven, 2000; Razin et al., 1998).

Estas bacterias colonizan las superficies mucosas del tracto respiratorio y tracto urogenital, ojos, tracto digestivo y articulaciones y se han aislado tanto en humanos como en animales

(Ferguson-Noel, 2013; Razin et al., 1998). En las aves las especies más importantes son Mg, Ms, Mm y Mi, los cuales son de gran preocupación en la avicultura causando enfermedad respiratoria y desórdenes reproductivos (Stipkovits & Kempf, 1996). De las anteriores especies, es importante reconocer que Mg y Ms pueden interactuar con otros agentes infecciosos del tracto respiratorio como el virus de la Enfermedad de Newcastle y el virus de la Bronquitis Infecciosa y con bacterias como *Escherichia coli*, formando parte del complejo respiratorio aviar y observando una sinergia entre ellos (Kleven, 1998). Sin embargo, se ha identificado que como agentes únicos pueden causar cuadros clínicos respiratorios, disminución en la producción de huevo y eclosión y tener consecuencias de decomisos en las carcasas (Armour et al., 2013).

La manera en que los micoplasmas inducen enfermedad involucra la interacción entre el patógeno, el hospedero y el ambiente. Se ha reportado que factores como la alta densidad, el estrés por calor o frío, el exceso de amoníaco, la acumulación de heces, la falta de limpieza en galpones, entre otros, pueden contribuir a la propagación y la aparición de la enfermedad (Bradbury, 2005). Otro aspecto importante es la capacidad de eludir el sistema inmune del hospedero. Para este fin, los micoplasmas utilizan un mecanismo denominado plasticidad fenotípica, que se define como la capacidad de un único genotipo para modificar la composición antigénica produciendo diferentes formas que son alternativas en morfología, estado fisiológico y respuesta ante condiciones ambientales (Bradbury, 2005; Gorbachev et al., 2013; Rottem, 2003). La plasticidad fenotípica puede lograrse mediante dos mecanismos, bien sea una respuesta a señales ambientales o cambios aleatorios de la expresión de uno o varios genes. El uso de vías de transducción de señales para detectarlas en el entorno del hospedador y responder en consecuencia expresando productos génicos es necesaria para la supervivencia en el hospedador (Rottem, 2003).

Sin embargo, gracias a la aparente escasez de genes reguladores que funcionen como sensores de los estímulos ambientales y de genes que codifiquen factores transcripcionales, la forma habitual de conseguir plasticidad fenotípica en los micoplasmas es mediante la variación antigénica, es decir, la ganancia o pérdida reversible de componentes de superficie, la cual es una estrategia de supervivencia utilizada por los patógenos bacterianos (Rottem, 2003; Wren, 2000). La mayoría de los componentes variables de los micoplasmas son las proteínas de superficie, las cuales

son los principales objetivos de la respuesta de anticuerpos del hospedador. Por lo tanto, la capacidad de un microorganismo para cambiar rápidamente el repertorio antigénico de superficie y, en consecuencia, variar la inmunogenicidad de estos componentes permite al microorganismo evitar la detección o superar al sistema inmunitario del hospedador (Wren, 2000).

La importancia de esta enfermedad en la avicultura ocasionada bien sea por Mg o Ms, radica en diferentes aspectos. Con respecto a Mg, el impacto económico es relevante debido a que afecta los parámetros productivos al reducir la ganancia de peso entre el 20% y el 30%, disminuir la conversión alimentaria entre el 10% y el 20%, ocasionar tasas de mortalidad que pueden estar entre el 5% y 10%, además del decomiso de carcasas entre el 10 y el 20%. En cuanto a Ms, los parámetros productivos se ven igualmente afectados, pudiendo causar una reducción en la producción de huevo entre el 5% al 10% y de la incubabilidad entre un 5% y 7% con un aumento de la mortalidad de más del 5% en pollitos sin signos clínicos evidentes (Stipkovits & Kempf, 1996).

1.1 Cuadro clínico de Micoplasmosis aviar

El cuadro clínico de la infección por Mg en pollos se caracteriza por la presentación de signos respiratorios como estertores traqueales, descarga nasal y tos (Stipkovits & Kempf, 1996) generando lesiones en tráquea y pulmones (Figura 1-1, A y B); el consumo de alimento se reduce, resultando en consecuencia en pérdida de peso. En gallinas ponedoras se disminuye la producción de huevos, aunque se mantiene a unos niveles mínimos. En pollos de engorde, la mayoría de los casos se presentan después de la cuarta semana de edad, observándose signos más marcados en animales adultos (Ferguson-Noel, 2013). En cuanto a la transmisión de Mg esta puede darse tanto de forma vertical como horizontal, siendo más efectiva durante la fase aguda de la infección e influenciada por la habilidad de la cepa de replicarse en el tracto respiratorio (Stipkovits & Kempf, 1996).

Por su parte, en el caso de Ms los signos que se pueden observar incluyen cresta pálida o rojo azulado, cojera y retardo del crecimiento (Stipkovits & Kempf, 1996). La inflamación puede ser evidente en las articulaciones, sobre todo del tarso y las almohadillas. Los animales se muestran decaídos y deshidratados, puede haber estertores leves o incluso

la presencia de animales asintomáticos lo que complica el diagnóstico de la enfermedad (Ferguson-Noel, 2013); estas lesiones pueden observarse en la Figura 1-1. La transmisión de Ms es similar a la de Mg al ser tanto vertical como horizontal con tasas elevadas entre las primeras cuatro a seis semanas después de la infección; sin embargo, Ms se disemina más rápido que Mg (Stipkovits & Kempf, 1996).

Teniendo en cuenta la presentación de la enfermedad en aves comerciales, hay que resaltar la importancia de las aves silvestres debido al rol como potenciales reservorios y vectores de la infección tanto de Mg como de Ms gracias a su contacto estrecho con las aves domésticas. Los mecanismos patogénicos utilizados por los micoplasmas para sobrevivir dentro de las células del hospedero, inducir enfermedad y evadir el sistema inmunológico del mismo, incluyen la adhesión a las células objetivo del huésped, la variación antigénica de las proteínas de superficie, la mediación de la apoptosis y el daño a las células del hospedero (Yadav et al., 2022). Además, hay que tener en cuenta que la infección por alguno de los dos micoplasmas es una puerta de entrada a otros microorganismos, como el virus de la Bronquitis Aviar y el de la Enfermedad de Newcastle y de bacterias como *E. coli*, entre otros (Abdelrahman et al., 2021; Mugunthan et al., 2023a).

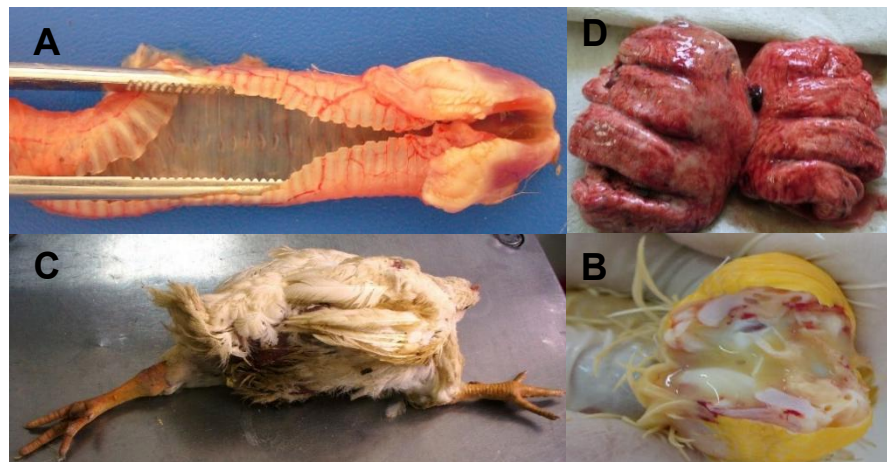


Figura 1-1 Lesiones macro de Micoplasmosis aviar causada por *M. gallisepticum* y *M. synoviae*. A. Congestión leve en tráquea. B. Cambio de coloración en pulmones asociados con congestión. C. Cojera progresiva con posturas anormales debido al dolor e inflamación de las articulaciones. D. Cápsula articular con exudado viscoso de color cremoso. Fuente: Laboratorio de Patología Aviar - UNAL

1.2 Aspectos relevantes del genoma de los micoplasmas

El genoma de los micoplasmas está constituido por un solo cromosoma formado por ADN circular de doble cadena, que puede variar entre 580 y 1.800 kb de acuerdo con la especie e incluso entre las mismas cepas. Kandavelmani y Piramanayagam (2019) realizaron un estudio donde compararon el genoma de 12 especies patógenas de micoplasmas, evidenciando diferencias en el tamaño del genoma, el número de genes, el porcentaje G+C, las proteínas codificantes y los genes ARNr, ARNt y otros ARN. Este tipo de información respecto a Mg y Ms se muestra en la **Tabla 1-1**.

Tabla 1-1. Información del genoma de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae*.

Especie	Tamaño del genoma (bp)	Número de genes	G+C (%)	Proteínas codificantes	ARNr	ARNt	Otros ARN
Mg	996,422 – 1,010,000	817	31.5	763	7	32	1
Ms	800,000 - 818,848	715	28.5	659	7	34	-

*Tabla adaptada de (Kandavelmani & Piramanayagam, 2019; Papazisi et al., 2003; Zhu et al., 2018).

En general, entre 20-30% del número total de genes en los genomas de los micoplasmas están involucrados en la transcripción, la traducción y la replicación. Dentro de estos, alrededor del 13-20% están implicados en la traducción; entre el 2 y el 4% en la transcripción y entre 6-11% del total de los genes participan en mecanismos de replicación, recombinación y reparación (Kandavelmani y Piramanayagam, 2019). Mientras que el porcentaje de genes a los que se les desconoce su función se encuentra entre el 2 y el 5%. Debido a la reducción de los genomas en el curso de su evolución degenerativa a partir de bacterias Gram positivas, existe una pérdida general de genes funcionales. Los genes implicados en el procesamiento y la modificación del ARN, la estructura y la dinámica de la cromatina, la estructura nuclear, la motilidad celular, el citoesqueleto y las estructuras extracelulares se han perdido por completo en los genomas. Adicionalmente, se observa en Mg una reducción de los genes implicados en

la biosíntesis, el transporte y el catabolismo de metabolitos secundarios, mientras que estos genes están ausentes en Ms (Kandavelmani & Piramanayagam, 2019).

En la naturaleza, existe una actividad enzimática encargada de preservar la integridad del genoma por parte de la dUTPasa. Si la actividad enzimática no se encuentra o es deficiente en los microorganismos, los procesos de reparación del ADN pueden verse alterados. A pesar de que hay evidencia de la presencia de genes asociados con la reparación del ADN en los micoplasmas, se podría considerar que se encuentran alterados, por tanto, la falta de detección de la enzima debe tenerse en cuenta al evaluar la eficacia del sistema de reparación del ADN, ya que esta deficiencia puede contribuir a las elevadas tasas de mutación que presentan los micoplasmas (Razin et al., 1998).

1.3 Variación antigénica en los micoplasmas

Como se mencionó anteriormente, la variación antigénica se refiere a la ganancia o pérdida de componentes de superficie de alta frecuencia, la cual es una estrategia de supervivencia habitual utilizada por los patógenos bacterianos. De esta manera, variar la inmunogenicidad de estas estructuras permite evitar eficazmente el reconocimiento inmunitario (Razin et al., 1998).

M. gallisepticum posee una gran familia de genes *pMGA*, actualmente conocida como *vlhA*, los cuales codifican copias variantes de una lipoproteína de superficie principal conocida como hemaglutinina. El número de copias del gen que se calcula que están presentes en el genoma varía de 32 en la cepa F a 70 en la cepa R, los cuales están dedicados exclusivamente a la generación de variantes del mismo antígeno de superficie (Razin et al., 1998). Tienen una repetición de trinucleótidos (GAA) que precede al inicio de la transcripción, una secuencia líder que codifica un péptido señal, un codón para la cisteína aminoterminal y una región rica en prolina hacia el extremo aminoterminal de la proteína madura (Benčina, 2002). Cuando están presentes 12 repeticiones GAA se permite la transcripción del *vlhA*, pero el mecanismo por el que este elemento controla la transcripción no está claro (Citti et al., 2010).

Un ejemplo de variación de este gen se ha observado en la cepa S6 al expresar un cambio del gen *vlhA1.1* al gen *vlhA1.9*. La manera de comprobarlo fue mediante un estudio *in*

vitro, en el cual se evidenció que células cultivadas en un medio que contenía el anticuerpo monoclonal 66 (mAb 66), que es específico de *vlhA1.1*, presentaban secuencias alteradas en el extremo 5' a los sitios promotores de ambos genes *vlhA1.1* y *vlhA1.9*. El número de repeticiones GAA localizadas aguas arriba de las cajas -35 tanto de *vlhA1.1* como *vlhA1.9* había cambiado en comparación con el de las células parentales S6. Concretamente, en las células parentales la región 5' de *vlhA1.1* contenía 12 repeticiones GAA, mientras que en las células cultivadas con mAb 66 sólo estaban presentes 10 de estas repeticiones. Por otro lado, en las células cultivadas en medio que contenía mAb 66, pero que tenían 12 repeticiones GAA 5' expresaban *vlhA1.9*, es decir que carecían de *vlhA1.1* (Glew et al., 1998), indicando que ambas son antigénicamente distintas (Benčina, 2002).

Para el caso de *M. synoviae*, las proteínas de superficie son los mayores objetivos de la respuesta inmune del hospedero. Se ha sugerido que una cepa de Ms con hemoaglutinación positiva induce con más frecuencia sinovitis aguda que su homóloga con hemoaglutinación negativa, indicando el importante papel de la hemaglutinina en la patogenicidad de este agente (Benčina et al., 2001b). A diferencia de los genes *vlhA* de Mg, sólo existe una copia del gen *vlhA* completo en el genoma de *M. synoviae*, considerado un homólogo del gen de Mg (Citti et al., 2010). Este gen pertenece a una familia, donde solo un miembro de la familia de genes Ms *vlhA* contiene un promotor, mientras que el resto de los genes de la familia carecen de uno y se denominan pseudogenes. El gen *vlhA* puede dividirse en tres regiones principales: conservada, semivariable y altamente variable. En la región conservada, en el extremo 5' se ha demostrado una "copia única" en el genoma, mientras que el resto de la región conservada y las regiones semivariable y altamente variable se han detectado en múltiples copias dentro de los pseudogenes. Los pseudogenes carecen de secuencias codificantes del extremo terminal 5'. La variación antigénica del producto VlhA de Ms es el resultado de la recombinación unidireccional que ocurre entre la copia funcional completa de *vlhA* y los pseudogenes, con duplicación de la secuencia del pseudogen y pérdida de la región correspondiente en el gen expresado previamente, como se puede observar en la Figura 1-2 (Citti et al., 2010). En la mayoría de las cepas de Ms, la hemaglutinina VlhA se escinde para producir un fragmento aminoterminal (MSPB) y un fragmento carboxiloterminal (MSPA) (Benčina, 2002). MSPA desempeña un papel importante, en donde anticuerpos policlonales y monoclonales inhiben la hemaglutinación

de Ms, lo que indica que MSPA media en la unión a eritrocitos (Benčina, 2002). Las hemaglutininas tienen que enfrentarse al reto de variar como estrategia de supervivencia, al tiempo que deben conservar sus propiedades funcionales. En Ms este papel parece atribuirse predominantemente al producto del gen *vlhA* (Khiari & Mardassi, 2012)

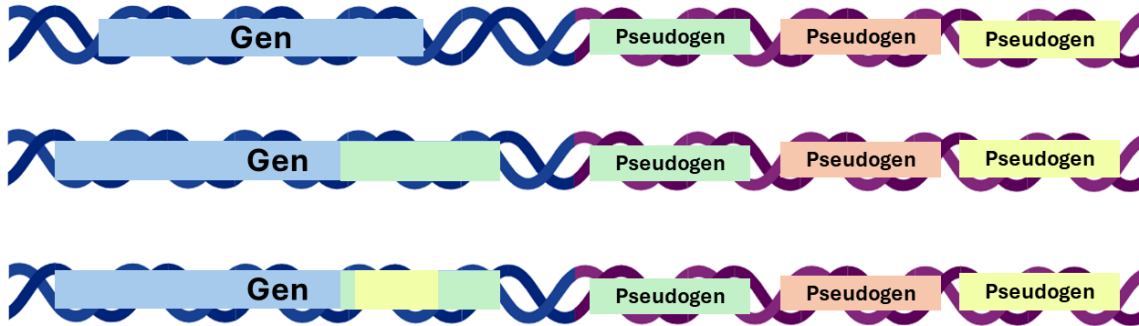


Figura 1-2. Esquema de la recombinación unidireccional de la región conservada y regiones variables del gen *vlhA* de *M. synoviae*. En color azul se representa la región conservada del gen *vlhA*, en morado la región variable donde se encuentran los pseudogenes. Cuando un pseudogen (verde y amarillo) por la recombinación unidireccional se establece en la región conservada, este empieza a expresarse. Mientras el pseudogen se quede en la región variable (naranja) no habrá expresión de este. Esta recombinación permite la variabilidad genética de la copia única de *vlhA* en Ms. Imagen adaptada de Citti et al., (2010).

La clave de su éxito en la colonización y supervivencia al hospedero puede estar en la capacidad de los agentes para alterar rápidamente la composición antigénica de su superficie a través de sistemas genéticos, permitiendo la evasión del sistema inmune (Citti et al., 2010). No es casualidad que ensayos de vacunas contra estos patógenos no hayan dado resultados efectivos y que la variabilidad antigénica de alta frecuencia contribuya en gran medida a la complejidad de la aplicación de medidas preventivas y de control (Citti et al., 2010). Además, a partir de los estudios de las hemaglutininas de Mg y Ms, la información que se obtiene tiene un potencial de aplicación, en especial en la preparación de antígenos mejorados. Aunque el seguimiento de la enfermedad se continuará realizando con pruebas serológicas de las aves de corral, será necesario disponer de antígenos y vacunas con determinantes antigénicos definidos que permitan desarrollar medidas de control coherentes y reproducibles (Benčina, 2002).

1.4 Diagnóstico

La prueba de oro para el diagnóstico de micoplasma es el aislamiento del patógeno mediante cultivo; sin embargo, este proceso es largo y lento debido a los requerimientos nutricionales y tiempo necesario para su crecimiento, por lo que resulta difícil y no permite un diagnóstico oportuno (Kleven, 2008). Por lo tanto, el diagnóstico de micoplasma se realiza mediante pruebas serológicas o de biología molecular.

La serología permite un tamizaje inicial mientras que realizar PCR, es una herramienta alternativa para el diagnóstico o como un parámetro confirmatorio para el cultivo o la detección por serología, los cuales al final pueden ser no concluyentes (Muhammad et al., 2018). Además de contribuir al diagnóstico, las pruebas moleculares también permiten realizar tipificación de los agentes, detectar genes o mutaciones asociadas con resistencia a antimicrobianos, además de la diferenciación de cepas de campo de cepas vacunales (**Figura 1-3**) (Feberwee et al., 2022). Sin embargo, la interpretación de los resultados puede estar influenciada por factores, como las reacciones serológicas cruzadas, el tratamiento antibiótico, la vacunación contra Mg y/o Ms y la fase de la infección (Bradbury, 2005).

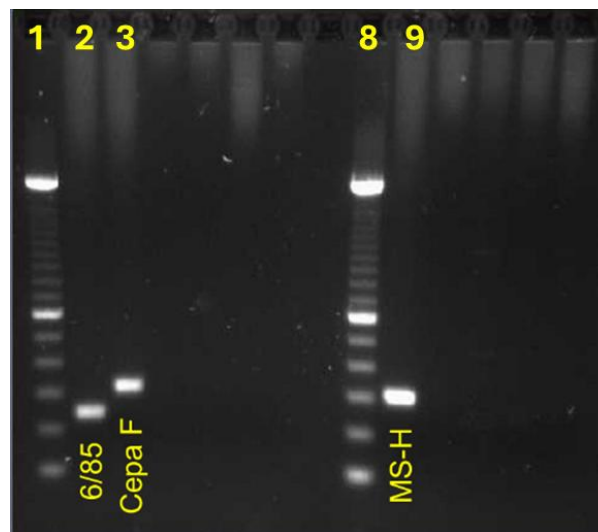


Figura 1-3. Gel de electroforesis con las cepas vacunales de *M. gallisepticum* y *M. Synoviae*. **Carriles 1 y 8.** Marcador de peso molecular de 100 pb. **Carril 2.** Cepa vacunal 6/85 de Mg. **Carril 3.** Cepa vacunal F de Mg. **Carril 9.** Cepa vacunal MS-H de Ms. Fuente: Laboratorio de Biología Molecular y Virología UNAL.

Adicionalmente, el diagnóstico va a contribuir al establecimiento de la epidemiología de la enfermedad, lo cual es vital para el diseño de programas de control y monitoreo. Gracias a esto se pueden establecer rutas de transmisión, supervivencia de Mg y Ms en el ambiente y su capacidad de infectar otras especies diferentes a los pollos de engorde, gallinas y pavos. En ese orden de ideas, es necesario tener en cuenta que existen diferentes formas de transmisión, una de ellas es de manera horizontal, la cual ocurre por contacto directo o indirecto con aerosoles o por introducir personas o materiales contaminados y la forma vertical a través del huevo, siendo la mayor ruta de diseminación de la infección con implicaciones económicas relacionadas a normativas de acuerdos internacionales existentes. El pico de transmisión por huevo ocurre a las 3-4 semanas después de la infección y es menor en la fase crónica (Feberwee et al., 2017, 2022; Ferguson-Noel, 2013; Kleven, 2008; ter Veen et al., 2021).

1.5 Control de la enfermedad

1.5.1 Antimicrobianos

Como parte del control de la enfermedad se hace uso de antibióticos como tratamientos profilácticos. Esto consiste en administrar los medicamentos en la primera semana de vida para reducir la infección proveniente desde el huevo; o en periodos de mucho estrés como vacunación, transporte o reagrupamiento, con el fin de reducir la presencia de signos clínicos (Morrow, 2024; Stipkovits & Kempf, 1996). Por otro lado, los micoplasmas son intrínsecamente resistentes a todos los antimicrobianos que tienen como objetivo la pared celular, como la fosfomicina, los glucopéptidos o los antibióticos betalactámicos (Gautier-Bouchardon, 2018). Por lo tanto, solo se utilizan algunos como las tetraciclinas, los macrólidos (tilosina y tilmicosina) y más recientemente, las fluoroquinolonas (enrofloxacina y difloxacina) y las pleuromutilinas (tiamulina) (Nhung et al., 2017). Sin embargo, los micoplasmas han presentado genotipos de resistencia a estos antibióticos en donde destacan los asociados a fluoroquinolonas ya que, junto a los macrólidos, son los que más se utilizan en la avicultura (Gerchman et al., 2011), a pesar de que en muchos países se encuentra prohibida la administración en animales para consumo humano (Yadav et al., 2022).

Además de su utilización profiláctica, ante la presencia de signos clínicos también se

administran antibióticos; aunque usualmente, no es regular realizar antibiogramas. Estas prácticas favorecen la presentación de RAM en las especies de micoplasmas. Aunque no existe riesgo de que la resistencia se transfiera directamente a los humanos, hay que tener en cuenta que el uso de estos productos genera una presión selectiva sobre todas las bacterias presentes en suelos y cuerpos de agua que tengan contacto con los antibióticos, al momento de desechar los medicamentos (Morrow, 2021). Ante la presentación de RAM, se han establecido estrategias internacionales como la de la OMSA para generar conciencia y mejorar la comprensión sobre el concepto de resistencia, reforzar los conocimientos a través de la vigilancia y la investigación, apoyar la buena gobernanza y el refuerzo de competencias, en donde se capacita a los profesionales para mejorar la sanidad y el bienestar animal y hacer un buena administración de sustancias antimicrobianas y por último, promover la aplicación de normas internacionales bajo el concepto de UnaSalud (OMSA, 2022). En específico para el caso de estos agentes, es importante establecer estrategias de control eficientes, teniendo en cuenta la resistencia intrínseca a ciertos compuestos y debido a su alta variabilidad genética sería importante reducir la administración de éstos. Sin embargo, es necesario invertir en investigaciones en este campo y en lo posible poder relacionar genotipos con la presentación de RAM.

1.5.2 Vacunas disponibles para micoplasma aviar

La vacunación contra la Micoplasmosis aviar en Colombia se basa principalmente en el uso de vacunas vivas atenuadas como la cepa F, ts-11 y 6/85 para Mg y la MS-H para Ms. Sin embargo, el uso de estas vacunas no garantiza un 100% de protección contra la enfermedad y debe hacer parte de un programa integral de control. Adicionalmente, dado que con este tipo de vacunas se busca desplazar cepas de campo y tratar de establecer las cepas vacunales en las producciones avícolas, se ha reportado la presencia de micoplasma en granjas avícolas no vacunadas que proviene posiblemente por su cercanía con granjas en que se utiliza vacunación (Feberwee et al., 2022).

Igualmente, para determinar si las cepas vacunales se establecen es necesario hacer uso de las técnicas moleculares, aprovechando su poder discriminatorio para identificar qué agente es el que está circulando. Por otro lado, vale la pena mencionar que en los últimos años se ha empleado la vacuna MS-H, la cual previene el desarrollo de los signos clínicos

y por consiguiente las pérdidas económicas que estos patógenos puedan generar (Omotainse et al., 2022).

Teniendo en cuenta las limitaciones existentes para un diagnóstico oportuno y certero de micoplasmosis aviar en nuestro país, la escasa información disponible en cuanto a las características moleculares de los micoplasmas que circulan en las explotaciones avícolas y la preocupación creciente por la aparición de microorganismos multirresistentes a antimicrobianos a nivel mundial, el objetivo de este trabajo es caracterizar genotipos y mutaciones asociadas con resistencia a antimicrobianos de *Mycoplasma gallisepticum* y *M. synoviae* en aves comerciales de Colombia. Lo anterior constituye un aporte al diagnóstico de la enfermedad en el país, mediante la caracterización de genotipos a partir de pools de muestras identificadas como Mg y/o Ms, considerando que actualmente se desconoce cuáles cepas circulan, sus características genotípicas y la eficacia real de las estrategias de control farmacológico. Asimismo, la información generada contribuirá al entendimiento de la problemática a nivel de campo y servirá para la evaluación y/o redireccionamiento de las estrategias de control utilizadas.

2. Nuevos perfiles alélicos en cepas colombianas de *Mycoplasma* spp. identificados mediante MLST

2.1 Introducción

La micoplasmosis aviar es una enfermedad que genera pérdidas económicas en granjas avícolas, principalmente de aves reproductoras y ponedoras y en menor medida las de pollo de engorde. Una primera manifestación es la disminución de los parámetros productivos, en donde las aves pueden consumir alimento solo si los comederos se encuentran cerca de los animales, de lo contrario, tienden a no moverse por los signos clínicos (Ferguson-Noel, 2013). Cuando los animales presentan signos clínicos como ruidos respiratorios, tos, descarga nasal o manifestaciones reproductivas (Ferguson-Noel et al., 2020, la primer medida de contención es el uso de antibióticos para ayudar a reducir los signos clínicos, en especial porque la enfermedad es la puerta de entrada a otros agentes bacterianos y virales (Levisohn & Kleven, 2000; Stipkovits & Kempf, 1996). Sin embargo, el control de la enfermedad, que se considera que se puede establecer a largo plazo, se basa principalmente en programas de bioseguridad junto con el uso de vacunas, especialmente vivas atenuadas, y un monitoreo constante del agente (Bradbury, 2005; OMSA, 2021; Yadav et al., 2022).

Lo anterior hace indispensable un diagnóstico oportuno, lo cual representa una problemática que deben enfrentar los médicos veterinarios, no solo en campo sino también a nivel de laboratorio ya que debido a las características propias del *Mycoplasma* el cultivo *in vitro* es difícil, por lo que es necesario recurrir a otras alternativas como la serología y la

biología molecular. Teniendo en cuenta las limitaciones que tiene el diagnóstico serológico para la caracterización y diferenciación de cepas de campo y cepas vacunales de los micoplasmas aviáres, particularmente *Mycoplasma gallisepticum* y *M. synoviae*, los cuales son los más importantes de su género en la avicultura (Ferguson-Noel et al., 2020; Kleven, 2008; OMSA, 2021) las técnicas moleculares han tomado fuerza en los últimos años como una medida complementaria o confirmatoria de los resultados obtenidos por pruebas serológicas, además de brindar resultados más rápidos y no requerir el cultivo microbiológico del *Mycoplasma* spp. (Khan, 2018). En ese orden de ideas, además del diagnóstico, otro reto frente a la enfermedad, en el que las metodologías moleculares aportan información valiosa es para diferenciar las cepas vacunales de las cepas de campo y establecer la existencia de genogrupos específicos presentes en un país o región. Para esto, se han implementado diferentes técnicas moleculares como la secuenciación dirigida de genes (GTS) la cual permite determinar secuencias parciales de genes de proteínas de superficie como *gapA*, *mgc2* y *pvpA* para Mg (Limsatanun et al., 2022b) y del gen *vlhA* para Ms (M. M. El-Gazzar et al., 2012; Wetzel et al., 2010). En este sentido, la GTS facilita la diferenciación de las cepas y representa una ventaja adicional porque se pueden utilizar muestras clínicas directamente sin necesidad de realizar un cultivo del micoplasma (Armour et al., 2013). Si bien, aunque este método de tipificación podría no ser adecuado para inferir el parentesco evolutivo, si puede identificar cepas relacionadas con cepas vacunales, lo cual es fundamental en el monitoreo de programas de control (Matucci et al., 2020).

Teniendo en cuenta lo anterior, se utilizan genes diana para la identificación tanto de Mg como Ms por medio de la GTS. En el caso de Mg, se utiliza principalmente la citoadhesina o *mgc2*, la cual interviene en el mecanismo de adhesión de Mg a su hospedero (Armour et al., 2013). De acuerdo con estudios previos este gen es útil para la identificación, pero no permite establecer diferencias entre las mismas cepas ni con la cepa vacunal F (M. El-Gazzar et al., 2017; Gharaibeh et al., 2011).

En el caso de Ms, la diana genómica es el gen de la hemaglutinina A de la lipoproteína variable VlHA (M. M. El-Gazzar et al., 2012; Wetzel et al., 2010) se ha demostrado que el análisis de la secuencia de ADN del gen *vlhA* es una herramienta útil para la detección y la tipificación inicial de las cepas (Ben-Aïna et al., 2001a). A partir de la región conservada de este gen, se han relacionado nueve genotipos (A-I) con infección en las articulaciones,

tracto respiratorio y sistema reproductivo, (Kursa et al., 2019). La región correspondiente a la “copia única” del gen, la cual es conservada y que se expresa, es fundamental para la discriminación entre cepas, dado que concentra las variaciones relevantes para este propósito. Por el contrario, las diferencias de secuencia localizadas en las regiones variables y que no se expresan, aunque se encuentren dentro de una misma cepa, no tienen relevancia para la genotipificación. (El-Gazzar et al., 2012). Es por esto por lo que, en muchos casos es complicado establecer el grado de parentesco entre las cepas, porque se ha reportado que, aunque están estrechamente relacionadas difieren en la secuencia parcial de su gen *vlhA*. Por lo tanto, es difícil determinar la relación evolutiva entre ellas gracias a que el gen tiene una naturaleza variable (El-Gazzar et al., 2017).

Con base en lo anterior, se han implementado técnicas como el esquema de tipificación de secuencias multilocus (MLST) de genes conservados, para evaluar el grado de parentesco entre los micoplasmas detectados o comparar entre aquellos de diferentes brotes, con el fin de rastrear las infecciones y determinar la fuente del patógeno (Bekó et al., 2019; M. El-Gazzar et al., 2017). De esta manera, el esquema de MLST ha sido ampliamente considerado como un patrón de oro para la tipificación microbiana de una manera profunda para Mg y Ms (Matucci et al., 2020). El MLST, se basa entonces en la utilización de genes *housekeeping* o constitutivos para la identificación molecular, los cuales no varían tanto como las lipoproteínas de superficie, resultando en una forma eficaz de determinar la relación entre las cepas de la especie (Limsatanun et al., 2022a). Algunos de los genes que se han empleado para Mg son: *atpG*, *dnaA*, *fusA*, *rpoB*, *ruvB* y *uvrA* (Bekó et al., 2019) (**Tabla 2-1**), Por otra parte, el esquema de MLST para Ms considera siete genes constitutivos: *adk*, *atpG*, *efp*, *gmk*, *nagC*, *ppa* y *recA* (**Tabla 2-2**), distribuidos por todo el genoma, los cuales son menos variables que *vlhA* (M. El-Gazzar et al., 2017). La ventaja de usar genes *housekeeping* es su lenta diversificación por la acumulación aleatoria de variaciones neutras o casi neutras, ya que no están sometidos a una presión selectiva inusual, como por ejemplo el sistema inmune de las aves. Esta presión selectiva si la tienen las glicoproteínas de superficie como *mgc2*, *vlhA* y *gapA* y, por lo tanto, sus altas tasas de mutación tienden a ocultar relaciones entre los aislados, mientras que un análisis multilocus de los *housekeeping* proporciona más información respecto a la relación evolutiva de los aislados (Spratt, 1999).

Tabla 2-1. Genes *housekeeping* del esquema MLST de *M. gallisepticum*.

Gen	Función	Referencia
<i>atpG</i>	Codifica para la producción de ATPasas que son enzimas que permiten la obtención de ATP a partir de ADP en el metabolismo energético.	Rasmussen et al., 1992
<i>dnaA</i>	Hace parte de un complejo de genes que forman las cajas ADNA, las cuales son esenciales para el inicio de la replicación. Estas cajas se encuentran cerca del origen de replicación (<i>oriC</i>).	Papazisi et al., 2003; Fujita et al., 1992
<i>fusA</i>	Codifica para el factor de elongación G (EF-G) el cual es clave para la traslocación del ribosoma durante la traducción.	Berčić et al., 2008; Corona et al., 2013
<i>rpoB</i>	Codifica para la subunidad β de la ARN polimerasa la cual está involucrada con la transcripción de ADN en ARNm. RpoB participa directamente en la elongación de la cadena de ARN durante la transcripción.	Adékambi et al., 2009; Trinh et al., 2006; Ovchinnikov et al., 1981 y Volokhov et al., 2012
<i>ruvB</i>	Forma un complejo RuvA-RuvB el cual usa energía a partir de la hidrólisis de ATP para movilizar ADN. La actividad del complejo es helicasa para el desenrollamiento del ADN para la unión Holliday.	Burgos & Totten, 2014; Tsaneva et al., 1993 y Chen et al., 2002
<i>uvrA</i>	Codifica para la proteína UvrA, la cual hace parte de las endonucleasas NER ABC, las cuales están relacionadas con la reparación por escisión de nucleótidos.	Fisunov et al., 2011; Singh et al., 2010 y Kulkarni et al., 2004

Tabla 2-2. Genes *housekeeping* del esquema MLST de *M. synoviae*.

Gen	Función	Referencia
<i>adk</i>	El gen está involucrado en el metabolismo de nucleósidos de purinas. Codifica para proteínas que catalizan reacciones de ATP para producir ADP.	O'Brien et al., 1981; Schulz et al., 1986.
<i>atpG</i>	Codifica para la producción de ATPasas que son enzimas que permiten la obtención de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico.	Nakanishi-Matsui et al., 2016.
<i>efp</i>	Es un factor de elongación que participa en la formación de enlaces peptídicos. Su función principal es actuar en la pausa que realiza el ribosoma durante la traducción de aminoácidos específicos como los residuos consecutivos de prolina, para acelerar el proceso.	Hummels & Kearns, 2021
<i>gmk</i>	Codifica para la enzima guanilato kinasa (GK). GK se encarga de catalizar la transferencia de un fosfato desde el adenosín trifosfato (ATP) al monofosfato de guanosina (GMP), para la obtención de energía.	Choi & Zocchi, 2007
<i>nagC</i>	Codifica para la kinasa N-acetilmanosamina la cual, junto a otros genes, se encargan de una vía metabólica de captura y degradación de ácido siálico, conocidas como sialidasas. En cepas Ms de aves sintomáticas hay registro de mayor actividad de sialidasas que en cepas de aves asintomáticas; sugiriendo un papel de la actividad de la sialidasa en la virulencia del organismo.	May & Brown, 2008
<i>ppa</i>	Su función se basa en el metabolismo de los lípidos, absorción de calcio, entre otras funciones, mediante la producción de pirofosfatasa inorgánicas.	J. Liu et al., 2011
<i>recA</i>	Se encuentra involucrado en la recombinación y reparación del ADN. La proteína se encuentra prácticamente en todas las bacterias y es clave para la regulación del genoma. RecA trabaja en la reparación de roturas de ADN de doble cadena.	Dybvig et al., 1992; Cox, 2007.

Estos métodos tienen como ventaja que no requieren el aislamiento en cultivo puro y representan un nuevo enfoque para el estudio de la epidemiología molecular de los agentes bacterianos (Yadav et al., 2022).

Con base en el contexto anterior el objetivo de este trabajo fue caracterizar genotipos de *Mycoplasma gallisepticum* y *M. synoviae* en aves comerciales como un aporte al diagnóstico de la Micoplasmosis aviar en Colombia

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Origen y Selección de muestras

Para este estudio se empleó un muestreo por conveniencia, seleccionando pools de ADN del banco de muestras del servicio de diagnóstico del Laboratorio de Biología Molecular y Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia (UNAL). Las muestras fueron obtenidas de hisopados traqueales, pulmonares, de líquido sinovial y de tarjetas FTA. Se revisó la información correspondiente a las muestras recibidas entre 2019 y 2023, periodo en el cual el laboratorio procesó 1.755 para la detección de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae*. Del total, el 27,3% (n = 479) correspondió a detecciones de alguno de estos agentes, distribuidas en 40,7% (n = 195) para Mg, 47,8% (n = 229) para Ms y 11,5% (n = 55) para ambas especies.

Con base en esta información, se seleccionaron 90 pools que contaran con datos completos sobre su procedencia a nivel departamental, tipo de producción (reproductoras, ponedoras comerciales o pollo de engorde) y edad de las aves (entre pollitos picados no nacidos–PIBS y 80 semanas). Estos pools se distribuyeron en tres grupos: 30 con detección de Mg, 30 con detección de Ms y 30 con detección simultánea de ambas especies.

2.2.2 Extracción de ADN y Selección de muestras

Para la detección de los agentes se realizó la amplificación de genes específicos para cada especie a través de PCR a partir del ADN previamente extraído con el kit comercial High Pure Viral Nucleic Acid® bajo las condiciones del fabricante y la calidad y cantidad

del ADN fue medido con un espectrofotómetro de microvolumen (Nanodrop®). En el caso de Mg se empleó como blanco el gen *mgc2*, el cual corresponde a un marco de lectura abierto (ORF) ampliamente conservado del genoma. Para Ms se identificó un segmento del gen de la lipoproteína variable, hemaglutinina A (*vlhA*), el cual posee regiones conservadas y variables con repeticiones en tándem ricas en prolina (PRR) y regiones altamente polimórficas (RIII). Los primers utilizados y los productos de amplificación esperados para estos genes se describen en la Tabla 2-3. La detección se realizó siguiendo los procedimientos operativos estándar (POE) establecidos en el Laboratorio de Biología Molecular y Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la UNAL.

Tabla 2-3. Primers para la identificación de *M. gallisepticum* y *M. synoviae* mediante PCR convencional.

Agente	Gen de Interés	Secuencia	Tamaño	Referencia
Mg	<i>mgc2</i>	F-CGCAATTTGGTCCTAATCCCAACA	235-302 Pb	(García et al., 2005)
		R-TAAACCCACCTCCAGCTTTATTTC		
Ms	<i>vlhA2</i>	F-CCATTGCTCCTGCTGTTAT	300-395 Pb	(Wetzel et al., 2010)
		R-GATTCTGTTGTAGTTGCTTCAA		

Para las mezclas *mgc2* y *vlhA* se utilizó la enzima Platinum™ Taq DNA Polymerase, DNA-free (Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Vilnius, Lituania). Para Mg, se agregó 7,16 µL de agua de grado molecular, 1 µL de buffer, 0,26 µL de MgCl₂, 0,2 µL de dNTPs, 0,16 µL de cada primer, 0,06 µL de la enzima y 1 µL del ADN para un volumen final de 10 µL. Para Ms, se agregó 6,9 µL de agua de grado molecular, 1 µL de buffer, 0,4 µL de MgCl₂, 0,2 µL de dNTPs, 0,2 µL de cada primer, 0,01 µL de la enzima y 1 µL del ADN para un volumen final de 10 µL. El programa de PCR consistió en una denaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos; 35 ciclos desnaturalización por 30 segundos a 95°C, anillamiento por 30 segundos a 55°C y extensión por un minuto a 72°C; al finalizar una extensión por 5 minutos a 72°C en un termociclador C1000 (Bio-Rad, Hercules, California, EE. UU). Los productos de PCR fueron revelados en gel de agarosa al 1,5%, observados mediante fotodocumentador GelDocXR® (Bio-Rad, Hercules, California, EE. UU.) y analizados con el software Quantity One Analysis 1-D 4.6.3® (Bio-Rad, Hercules, California, EE. UU.).

2.2.3 Esquema MLST para *Mycoplasma gallisepticum* y *M. synoviae*

Teniendo en cuenta la base de datos de PubMLST, el perfil alélico que se escogió para Mg fue de los siguientes genes: *atpG*, *dnaA*, *fusA*, *rpoB*, *ruvB* y *uvrA*. Se utilizó la enzima GoTaq® Green MasterMix (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EE. UU.), en una reacción con un volumen final de 10 µL en la que se agregó 5 µL de la mastermix, 0,5 µL de cada primer, 3 µL de agua de grado molecular y 1 µL de DNA de la muestra. El protocolo de PCR utilizado consistió en una desnaturalización inicial de 2 minutos a 95°C; 37 ciclos de desnaturalización por 30 segundos a 95°C, anillamiento por 30 segundos a 56°C y extensión por un minuto a 72°C; al finalizar una extensión por 5 minutos a 72°C (Bekó et al., 2019) en un termociclador C1000 (Bio-Rad, Hercules, California, EE. UU.). Los productos de PCR fueron revelados en gel de agarosa al 1,5%, observados mediante fotodocumentador GelDocXR® (Bio-Rad, Hercules, California, EE. UU.) y analizados con el software Quantity One Analysis 1-D 4.6.3 ® (Bio-Rad, Hercules, California, EE. UU.).

Para Ms, el perfil alélico seleccionado fue *adk*, *atpG*, *efp*, *gmk*, *nagC*, *ppa* y *recA*. Se utilizó la enzima GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EE. UU.) y el termociclador C1000 (Bio-Rad, Hercules, California, EE. UU.). Debido a las diferentes condiciones de cada gen, las mezclas de reacción para un volumen final de 10 µL, se encuentran descritas en la Tabla 2-4.

Tabla 2-4. Mezclas estandarizadas para los genes del esquema MLST de *M. synoviae*.

Gen	Agua	MgCl ₂	Primers	Buffer	dNTP's	TaqPol	ADN	Vf
<i>adk</i>								
<i>gmk</i>	5,1	1,2	0,5					
<i>ppa</i>								
<i>atpG</i>	5,5	1,2	0,3	1	0,5	0,2	1	10µL
<i>efp</i>	5,9	0,8	0,3					
<i>nagC</i>	5,5	1	0,4					
<i>recA</i>	5,3	1	0,5					

Vf: Volumen final

Para la PCR, el protocolo utilizado fue bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos, 40 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30

segundos, el anillamiento a 54°C (*adk*, *atpG*, *efp*, *gmk* y *nagC*), 56°C (*ppa*) y 57°C (*recA*), durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 90 segundos y extensión final a 72°C durante 5 minutos (M. El-Gazzar et al., 2017). Los productos de PCR fueron revelados en gel de agarosa al 1,5%; se emplearon 0.2 µl del buffer de carga EZ VISION® (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EE. UU.) y 2 µl de marcador de peso molecular GeneRuler 100 pb (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, EE. UU.). Los geles fueron observados mediante fotodocumentador GelDocXR® (Bio-Rad, Hercules, California, EE. UU.) y analizados con el software Quantity One Analysis 1-D 4.6.3 ® (Bio-Rad, Hercules, California, EE. UU.). Los primers que se utilizaron se encuentran en la Tabla 2-5.

Tabla 2-5 Primers utilizados para los esquemas MLST para Mg y Ms.

Técnica	Gen de interés	Secuencia	Tamaño del producto	Referencia
MLST Mg	<i>atpG</i>	F-TGGAACTAACTAAATTCGTTTTTAAGA R-TAGCATACTCACACTTTGGATTCA	395 Pb	(Bekő et al., 2019)
	<i>dnaA</i>	F-GAGCGTCAAAAATTATCCAGAG R-TTACGAATATCGCCTTCATCAA	461 Pb	
	<i>fusA</i>	F-CAGTAGCAGTATTAGATGCCCAAATG R-TAGTAGGGATCTGTACTTCTTCACCAA	597 Pb	
	<i>rpoB</i>	F-GTTAATGCTTAAAGAACAACCTTGATTTATT R- GGTTAATTGGTGC GTGTTAAAGAA	562 Pb	
	<i>ruvB</i>	F-CAACGACAATGTATGGCAGGAT R-AAACAATCAATCCACTTATTAGTGAAA	388 Pb	
	<i>uvrA</i>	F-TTTACCAATCTTAATGTGAATAAAGCC R-CCGTTCCCTGGGTGGAGTT	536 Pb	
MLST Ms	<i>adk</i>	F-GCTTTGGATTAGATTCWGAGCTA R-TTCTTATGGGAATGCCAGGTT	585 Pb	(El-Gazzar et al., 2017)
	<i>atpG</i>	F-GCTACAATTTTCGGTTATTTCTTGAG R-ATGCTATGCAGYTGTTTCTACTT	784 Pb	
	<i>efp</i>	F-CGACATATTTACCGGTTTCAGTT R-CTGGAATTACATTTCAAGATTCAGGAA	522 Pb	
	<i>gmk</i>	F-TCAATGTCTAACTCCTTGTGAAGA R-TTTACAGGTCCATCAGGTGTT	563 Pb	
	<i>nagC</i>	F-CCGATTATTCCGGCGTTATT R-ATYGGGGGCACTTCTATTAAT	803 Pb	
	<i>ppa</i>	F-AGTAATTGAAATTCAAAAGGCTCA R-AACTATATTTCTCTGGATGTTTTTCTT	530 Pb	
	<i>recA</i>	F-CTTTACCTTGCGCTACGTTATT R-TTCGGAAAAGAATCTATTATGGTTC	847 Pb	

Para la secuenciación de ADN realizó primero un proceso de purificación utilizando acetato de amonio y etanol absoluto al 80%; la precipitación de ADN se llevó a cabo mediante una serie de ciclos de centrifugaciones; el primero durante 30 minutos a 10000 rpm, seguido por dos ciclos a 12000 rpm durante 10 minutos cada uno. Posteriormente, se eluyeron las muestras con agua de grado molecular, se cuantificó el ADN purificado y se ajustó a la

concentración de 7 ng/μL para cada reacción con sus respectivos primers forward y reverse. La secuenciación se llevó a cabo en el Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, utilizando el método de Sanger. La información así obtenida se analizó mediante programas bioinformáticos como MultAlin, Chromas y Mega 10, comparando los resultados de estas secuencias con aquellas disponibles en la base de datos PubMLST para identificar los alelos respectivos de cada gen *housekeeping* y establecer los perfiles alélicos y las secuencias tipo (ST).

2.2.4 Construcción de árboles filogenéticos a partir de MLST

Para la construcción de los árboles filogenéticos de *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae*, se utilizaron las secuencias obtenidas de los loci incluidos en los esquemas MLST. Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa MEGA 10 mediante el algoritmo MUSCLE, y se construyó una concatenación en orden alfabético de los genes correspondientes para cada especie. Los árboles filogenéticos se generaron utilizando el método de Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood), bajo el modelo de sustitución de nucleótidos Kimura 2 parámetros (K2P), con 1000 réplicas de bootstrap para evaluar la robustez de las agrupaciones. Se construyeron cuatro árboles, dos para cada especie de micoplasma. En el caso de Mg, la construcción del primer árbol se basó en el gen *atpG* que fue el que tuvo más alelos identificados, e incluyó las 17 muestras obtenidas, junto con cuatro cepas de referencia: las cepas K 5831 B-19 y 6/85 vacunales y las cepas virulentas R(low) y R(high). El segundo árbol incluyó las secuencias concatenadas de Mg y se construyó con las 17 secuencias de las muestras y dos cepas vacunales. En el caso de Ms, el primer árbol se construyó con base en el gen *nagC* que fue el que tuvo más alelos identificados e incluyó las 19 muestras obtenidas, junto con ocho cepas de referencia: cepa 53, la MS-H vacunal, la ATCC 25204 y cepas de aislamientos de otros estudios como 86079-7NS, 1968, ULB08/T3, IT2/A (Kursa et al., 2019) y la IZSVE/3757/D13/2 (Kreizinger et al., 2018). El segundo árbol incluyó las secuencias concatenadas de Ms; este se construyó con 19 secuencias de las muestras y las ocho cepas de referencia.

2.3 Resultados

2.3.1 *M. gallisepticum* y *M. Synoviae* fueron detectados mediante amplificación por PCR convencional de *mgc2* y *vlhA*.

Se consideró un resultado positivo para detección de Mg y/o de Ms en las muestras que revelaron bandas de amplificación en el gel de agarosa con un peso molecular entre 235-302 pb para el gen *mgc2* y entre 300-395 pb para el gen *vlhA*, de acuerdo con lo esperado y como se puede observar en la Figura 2-1.

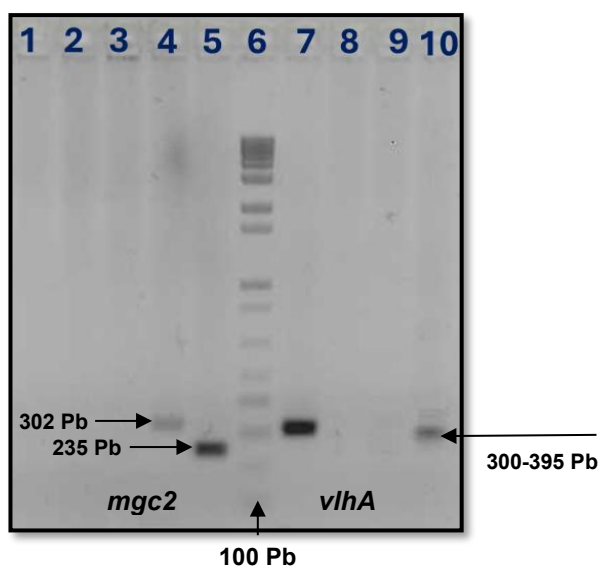


Figura 2-1. Amplificación de genes *mgc2* y *vlhA* para *M. gallisepticum* y *M. Synoviae*. La figura muestra productos de amplificación en un gel de agarosa al 1,5%. Carriles 1-3 Muestras negativas *mgc2*. Carril 4 Muestra positiva *mgc2*. Carril 5 C+ *mgc2*. Carril 6 Marcador de peso molecular 100 pb Carril 7 C+ *vlhA*. Carriles 8,9 y 11 Muestras negativas *vlhA*. Carril 10 Detección de *vlhA*.

2.3.2 El mayor porcentaje de muestras disponibles para análisis provino de aves reproductoras y del departamento de Santander

En relación con el tipo de producción, en el grupo de detección de *Mycoplasma gallisepticum* (Tabla 2-6), la mayoría correspondieron a reproductoras (n=21; 70%), seguidas por ponedoras (n=7; 23,3%) y pollo de engorde (n=2; 6,7%). En cuanto a la procedencia, el departamento de Santander tuvo una mayor proporción (n=10; 33,3%),

seguido de Cundinamarca (n=14; 46,7%) y Tolima (n=3; 10%), mientras que Antioquia (n=1; 3,3%), Huila (n=1; 3,3%) y Norte de Santander (n=1; 3,3%) tuvieron menor representación. Para la edad, se tuvo en cuenta el tipo de producción, por lo tanto, para las reproductoras varió entre 1 día (Pibs) y 48 semanas; en ponedoras fue entre 16 a 36 semanas y en pollo de engorde fue entre 5 días y 3 semanas. Con respecto al tipo de muestra, la mayoría correspondió a FTA (n=19; 63,3%), seguida por HT (n=9; 30,0%), HT y HO (n=1; 3,3%) y HSA (n=1; 3,3%).

Tabla 2-6. Muestras de detección de *M. gallisepticum* seleccionadas para realizar esquema MLST.

Tipo de producción	Procedencia	Edad	ID	Tipo de muestra	Año de recolección
Reproductoras	Santander	35	19012-2	HT	2019
	Santander	46	19022-1*	HT	
	Santander	46	19043	HT	
	Santander	15	19079	HT	
	Cundinamarca	Pipbs	19146-2	FTA	2020
	Tolima	30	20008	FTA	
	Cundinamarca	26	20009	FTA	
	Cundinamarca	48	20048*	FTA	2021
	Santander	35	21007	HT	
	Tolima	6	21018	FTA	
	Tolima	16	21020	FTA	
	Cundinamarca	23	21048	FTA	
	Santander	PIBS	21136*	HT y HO	2022
	Cundinamarca	20	22047	FTA	
	Cundinamarca	22	22117	FTA	
	Cundinamarca	48	22179*	FTA	
	Santander	15	22196	HT	
	Cundinamarca	33	22284	FTA	
Cundinamarca	43	22285	FTA		
Cundinamarca	33	23044*	FTA		
Santander	5	23265-1*	HT	2023	
Ponedoras	Antioquia	25	20054	FTA	2020
	Santander	36	21203	FTA	2021
	Santander	34	22005-1*	HT	2022
	Cundinamarca	32	22219*	FTA	
	N. de Santander	20	23299	FTA	2023
	Huila	24	23354*	FTA	
Cundinamarca	16	23430*	FTA		
Pollo de engorde	Cundinamarca	5d	19217	HT	2019
	Cundinamarca	3	20126	HSA	2020

HT: Hisopos traqueales. **FTA:** Tarjetas FTA. **HO:** Hisopo de órganos. **HSA:** Hisopos de sacos aéreos. **PIBS:** Pollitos picados no nacidos. * Muestras de Mg con perfil alélico completo.

A todas las muestras de la Tabla 2-6, se les realizó el esquema MLST de seis genes reportado para Mg, de las cuales a 10 muestras (en vinotinto) se les pudo obtener el perfil alélico completo.

Respecto al grupo de 30 muestras para *M. synoviae* (Tabla 2-7), la distribución por tipo de producción mostró que la mayoría correspondieron a reproductoras (n=24; 80%), seguidas por ponedoras (n=5; 16,7%) y pollos de engorde (n=1; 3,3%). En cuanto a la procedencia, Santander fue el departamento con mayor proporción (n=7; 23,3%), seguido por Cundinamarca (n=6; 20%), Antioquia (n=4; 13,3%), Tolima (n=4; 13,3%) y Valle del Cauca (n=4; 13,3%), mientras que Boyacá aportó una muestra (n=1; 3,3%). La edad de grupo varió entre 1 día (incluidos Pibs) y 78 semanas para reproductoras y ponedoras y el pollo de engorde fue de 1 día. Respecto al tipo de muestra, el 90% correspondió a hisopos traqueales (HT) (n=27; 90%), mientras que 2 (6,7%) fueron HT y HSA, y una de HT y HSAA (3,3%).

Tabla 2-7. Muestras con detección de *M. synoviae* seleccionadas para realizar esquema MLST.

Tipo de producción	Procedencia	Edad	ID	Tipo de muestra	Año de recolección	
Reproductoras	Cundinamarca	80	19034*	HT	2019	
	Antioquia	64	19118*	HT		
	Santander	14	19205-2	HT		
		Tolima	57	20087-1*	HT	2020
		Santander	55	19282	HT	2019
		Cundinamarca	62	20100	HT	2020
		Santander	26	20148	HT	
		Santander	53	20183	HT	
		Cundinamarca	11	21244	HT	2021
		Santander	PIBS	21265	HT y HSAA	
		Cundinamarca	78	21342-12*	HT	
		Tolima	7	22011-1	HT	2022
		V. del Cauca	71	22050-1	HT	
		Tolima	15	22089*	HT	
		Antioquia	8	22138	HT	
		Cundinamarca	35	22160	HT	
		V. del Cauca	40	22247	HT	
		Santander	40	23047*	HT	2023
		Santander	50	23137	HT	
		V. del Cauca	20	23304	HT	
	Antioquia	10	23334	HT		
	Santander	45	23400*	HT		
	Boyacá	36	21026*	HT		
	Tolima	25	22183	HT	2022	
Ponedoras	V. del Cauca	30	21086	HT	2021	
	Antioquia	1d	21270	HT y HSA		
	Cundinamarca	78	21342-5*	HT		
		Santander	48	22029-3*	HT	2022
		Santander	55	23510*	HT	2023
Pollo de engorde	Santander	1d	21264-2	HT y HSA	2021	

HT: Hisopos traqueales. **HSAA:** Hisopos de sacos aéreos abdominales. **HSA:** Hisopos de sacos aéreos. **PIBS:** Pollitos picados no nacidos. * Muestras de Ms con perfil alélico completo.

A todas las muestras de la Tabla 2-7, se les realizó el esquema MLST de siete genes reportado para Ms, de las cuales a 11 muestras (en verde) se les pudo obtener el perfil alélico completo.

Finalmente, en el grupo de detección simultánea en la Tabla 2-8, la mayoría correspondieron a reproductoras (n=19; 63,3%), seguidas por ponedoras (n=11; 36,7%) y no hubo muestras de pollo de engorde. En cuanto a la procedencia, Santander fue el departamento con mayor número de muestras (n=14; 46,7%), seguido por Cundinamarca (n=6; 20%), Valle del Cauca (n=3; 10%), Antioquia (n=1; 3,3%) y Tolima (n=1; 3,3%). La

edad de reproductoras fue entre 14 a 60 semanas y de ponedoras entre 12 y 79 semanas. Respecto al tipo de muestra, la mayoría correspondió a HT (n=22; 73,3%), seguidas por FTA (n=6; 20%) y HA (n=1; 3,3%).

Tabla 2-8. Muestras con detección de *M. gallisepticum* y *M. synoviae* seleccionadas para realizar esquema MLST.

Tipo de producción	Procedencia	Edad	ID	Tipo de muestra	Año de recolección	
Reproductoras	Santander	48	19022-2*	HT	2019	
	V del Cauca	21	19052	HA		
	Cundinamarca	49	19054*	HT		
	Santander	28	19088	HT		
	Santander	60	19111-2	FTA		
	V. del Cauca	26	19160**	HT		
	V. del Cauca	34	19188	FTA	2020	
	Santander	46	20128-1	HT		
	Santander	46	20128-2*	HT	2021	
	Santander	44	21174*	HT		
	Santander	51	21259-2	HT	2022	
	Santander	59	22029-5**	HT		
	Cundinamarca	27	22030	FTA	2023	
	Santander	15	22268*	HT		
	Santander	14	23028*	HT		
	Santander	30	23158	HT		
Santander	41	23211	HT			
Santander	40	23232	HT			
Ponedoras	Santander	45	23306*	HT	2021	
	Antioquia	34	21119	FTA		
	Cundinamarca	79	21342-4	HT		
	Cundinamarca	59	21342-10*	HT		
	Cundinamarca	58	21342-11	HT		
	Santander	79	21344-4*	HT		
	Santander	17	21353-1	HT		
	Santander	36	21353-3*	HT		
	Santander	24	22005-3	HT		2022
	Santander	20	22005-4*	HT		
Santander	12	22075	FTA	2021		
Santander	17	21353-2	HT			

HT: Hisopos traqueales. **FTA:** Tarjetas FTA. **HA:** Hisopo de articulaciones. * Muestras con perfil Mg completo. * Muestras con perfil Ms completo. ** Muestras con perfil completo de Mg y Ms.

En la Tabla 2-8, que corresponde al grupo de Mg-Ms, a las 30 muestras se les realizó tanto el esquema para Mg como para Ms. Se obtuvieron siete muestras para Mg y ocho para Ms con los perfiles alélicos completos (en Vinotinto y verde), de las cuales dos muestras (19160 y 22029-5, en lila) tienen esquema completo tanto para Mg como para Ms

2.3.3 Se evidenció por primera vez un esquema MLST de Mg en Colombia con un perfil alélico único que no había sido reportado previamente

Los productos amplificados de los seis genes de Mg fueron revelados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y los resultados se presentan en la Figura 2-2.

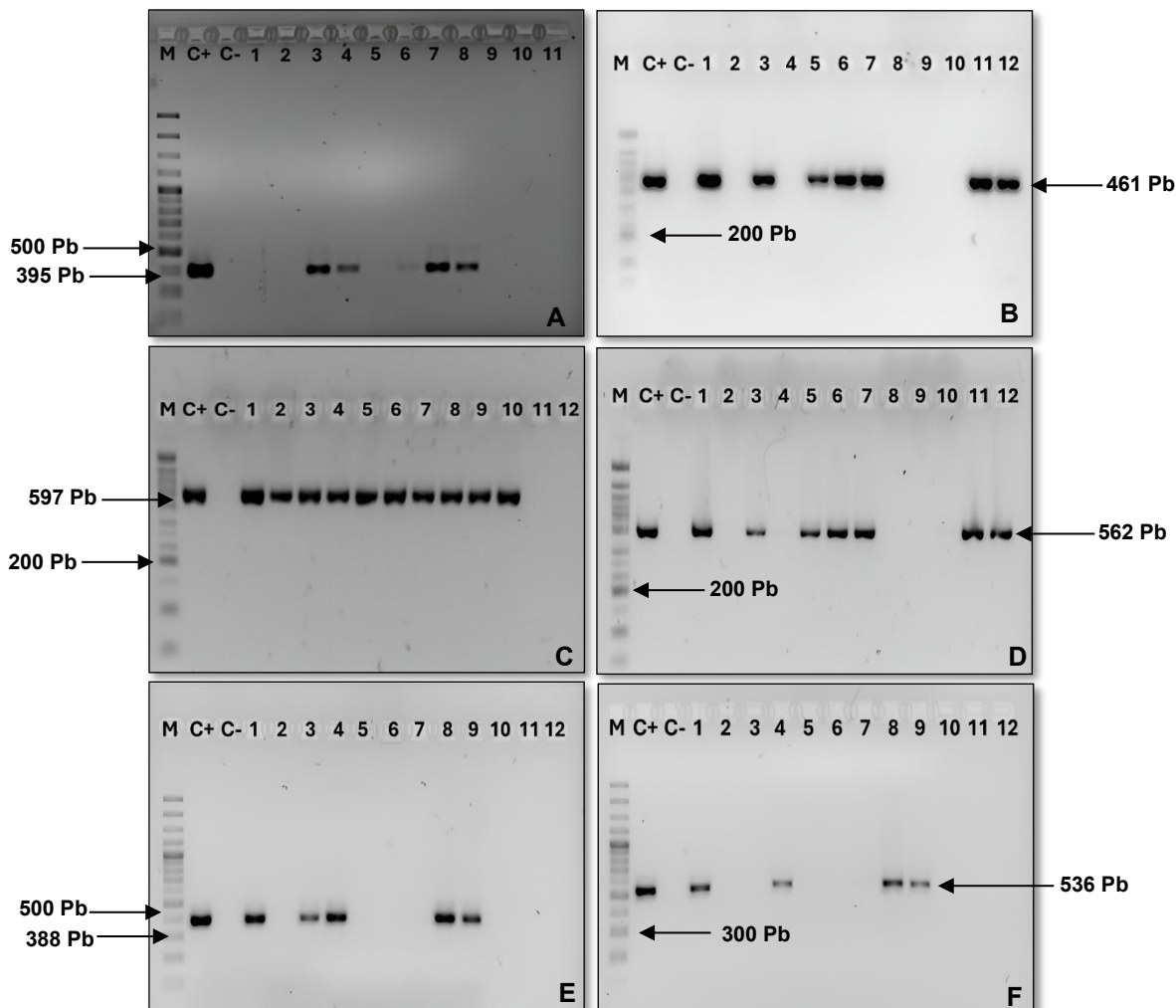


Figura 2-2: Esquema MLST para Mg. La figura muestra las detecciones de cada uno de los genes en geles de electroforesis **A.** Gen *atpG* (395 pb) **B.** Gen *dnaA* (461 pb) **C.** Gen *fusA* (597 pb) **D.** Gen *rpoB* (562 pb) **E.** Gen *ruvB* (388 pb) **F.** Gen *uvrA* (536 pb). **M.** Marcador de peso molecular entre 50 y 100 PB. **C+** vacuna 6/85. **C-** agua ultrapura.

En 10 de las 30 muestras (33,3%) de *Mycoplasma gallisepticum* analizadas se obtuvo el esquema completo, permitiendo la asignación de sus respectivos perfiles alélicos. La ST147 establecida para la muestra 19022-1 (10%), corresponde a la primera con un esquema MLST de Mg reportado de Colombia, presentando además un perfil alélico único

que no había sido reportado previamente. Dentro de las otras muestras, se identificaron dos (23265-1 y 21136; (20%)) con un perfil alélico coincidente, pero sin asignación de ST (ND) en la base de datos PubMLST. Además, siete muestras (23044, 20048, 22005-1, 23354, 22179, 23430 y 22219; 70%) compartieron el mismo perfil alélico y fueron clasificadas dentro de la ST5, la cual está relacionada como un perfil vacunal.

En la Tabla 2-9 se muestran los resultados de perfiles alélicos y ST a partir del MLST de las muestras de *Mycoplasma gallisepticum* de las que se obtuvo el esquema completo de los seis genes seleccionados.

Tabla 2-9. Perfiles alélicos y ST obtenidos del MLST de *Mycoplasma gallisepticum*.

ID	<i>atpG</i>	<i>dnaA</i>	<i>fusA</i>	<i>rpoB</i>	<i>ruvB</i>	<i>uvrA</i>	ST
23265-1	5	1	35	9	7	3	ND
21136	5	1	35	9	7	3	ND
19022-1	4	19	1	8	28	21	147
23044	1	18	2	21	8	3	5
20048	1	18	2	21	8	3	5
22005-1	1	18	2	21	8	3	5
23354	1	18	2	21	8	3	5
22179	1	18	2	21	8	3	5
22219	1	18	2	21	8	3	5
23430	1	18	2	21	8	3	5

En la tabla las nuevas ST se encuentran resaltadas en azul; las ST 5 asociadas a la cepa vacunal F se encuentran resaltadas en morado. **ND:** No determinado en PubMLST.

2.3.4 El esquema MLST de detecciones de *M. Synoviae* permitió evidenciar la existencia de ST únicas

Los productos amplificados fueron revelados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y los resultados se presentan en la Figura 2-3.

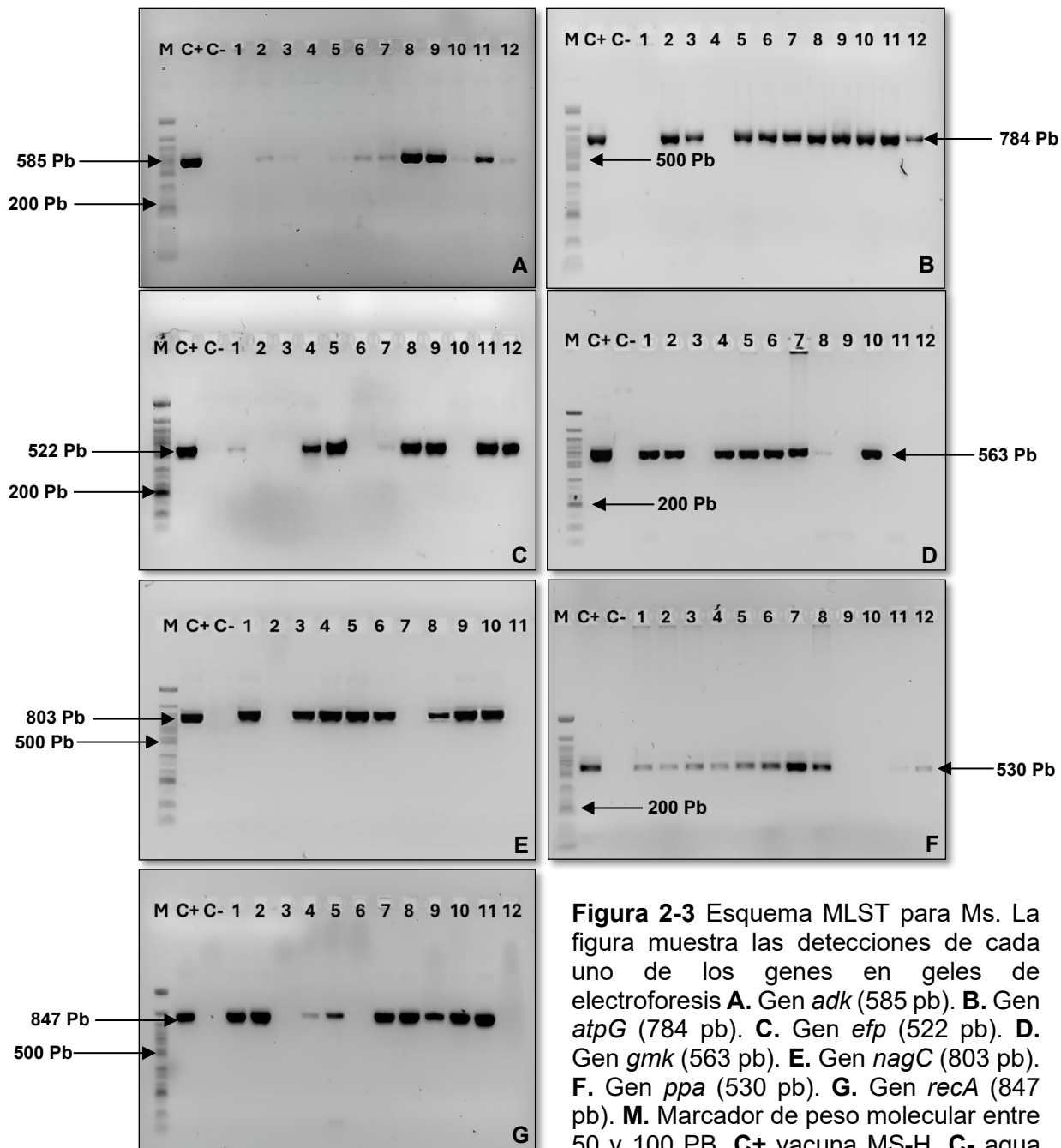


Figura 2-3 Esquema MLST para Ms. La figura muestra las detecciones de cada uno de los genes en geles de electroforesis **A.** Gen *adk* (585 pb). **B.** Gen *atpG* (784 pb). **C.** Gen *efp* (522 pb). **D.** Gen *gmk* (563 pb). **E.** Gen *nagC* (803 pb). **F.** Gen *ppa* (530 pb). **G.** Gen *recA* (847 pb). **M.** Marcador de peso molecular entre 50 y 100 PB. **C+** vacuna MS-H. **C-** agua ultrapura.

En 11 de las 30 muestras seleccionadas, (36,7%) se logró la amplificación de los genes propuestos, lo que permitió establecer sus respectivos perfiles alélicos. Dos de las 11 muestras, la 23400 y 23510 (18,2%), presentaron un perfil alélico idéntico y el resto presentó ST únicas a pesar de que puedan compartir alelos en seis de los siete loci con

variaciones principalmente en *nagC* o *recA*. De acuerdo con estos resultados y que no fue posible asignar una secuencia tipo (ST), todas las muestras figuran como “ND”.

En la Tabla 2-10 se muestran los resultados de perfiles alélicos y ST a partir del MLST de las muestras de *Mycoplasma synoviae* de las que se obtuvo el esquema completo de los siete genes seleccionados.

Tabla 2-10. Perfiles alélicos y ST obtenidos del MLST de *Mycoplasma synoviae*.

ID	<i>adk</i>	<i>atpG</i>	<i>efp</i>	<i>gmk</i>	<i>nagC</i>	<i>ppa</i>	<i>recA</i>	ST
21342-5	14	6	2	1	28	1	27	ND
22029-3	17	19	2	35	10	1	6	ND
22089	7	1	5	2	20	1	10	ND
21342-12	14	1	2	1	36	19	10	ND
21026	11	1	5	35	18	1	39	ND
19034	17	19	2	1	18	1	6	ND
19118	5	19	2	2	34	4	27	ND
20087-1	17	19	2	33	73	1	6	ND
23047	17	1	2	1	28	1	6	ND
23400	17	24	11	1	28	8	6	ND
23510	17	24	11	1	28	8	6	ND

Las ST resaltadas en naranja corresponden a un mismo perfil alélico. **ND:** No determinado en PubMLST.

2.3.5 Se encontraron diferentes resultados en esquema MLST de muestras con detección simultánea de *M. gallisepticum* y *M. synoviae*

En el grupo de muestras en el que se detectó de manera simultánea la presencia de Mg y Ms, se aplicaron ambos esquemas de MLST. Los resultados obtenidos de las muestras con esquemas completos se encuentran en la Tabla 2-11 para Mg y 2-12 para Ms.

Tabla 2-11. Perfiles alélicos y ST obtenidos del MLST de *Mycoplasma gallisepticum* de muestras con detecciones Mg-Ms

ID	<i>atpG</i>	<i>dnaA</i>	<i>fusA</i>	<i>rpoB</i>	<i>ruvB</i>	<i>uvrA</i>	ST
21174	5	1	35	9	7	3	ND
21353-3	13	11	14	8	9	4	ND
19022-2	33	19	1	8	28	21	ND
19160	1	18	2	21	8	3	5
22029-5	1	18	2	21	8	3	5
23028	1	18	2	21	8	3	5
19054	1	18	2	21	8	3	5

En la tabla las nuevas ST se encuentran resaltadas en azul; las ST 5 asociadas a la cepa vacunal F se encuentran resaltadas en morado. **ND:** No determinado en PubMLST.

ND: No determinado en PubMLST.

Tabla 2-12. Perfiles alélicos y ST obtenidos del MLST de *Mycoplasma synoviae* de muestras con detecciones Mg-Ms

ID	<i>adk</i>	<i>atpG</i>	<i>efp</i>	<i>gmk</i>	<i>nagC</i>	<i>ppa</i>	<i>recA</i>	ST
19160	7	2	2	1	36	19	27	ND
20128-2	17	19	2	9	10	4	10	ND
21342-10	14	41	2	1	73	8	10	ND
21344-4	11	1	5	1	34	1	19	ND
22005-4	11	19	5	1	73	8	27	ND
22029-5	5	1	3	1	73	1	10	ND
22268	4	2	2	2	2	1	2	43
23306	4	2	2	2	2	1	2	43

Las muestras identificadas como ST 43, asociadas con aislamientos de Europa del Este, se encuentran resaltadas en naranja. **ND:** No determinado en PubMLST.

En el caso del perfil de *M. gallisepticum* de este grupo, siete muestras (23,3 %) cumplieron con el esquema completo. De estas, cuatro (13,3 %), identificadas como 19160, 22029-5, 23028 y 19054, compartieron el mismo perfil alélico y fueron clasificadas como ST5. Las otras tres muestras obtuvieron ST ND, sin reporte previo y totalmente únicas. Para *M. synoviae*, ocho muestras (26,7 %) completaron el esquema MLST. Dos de ellas (22268 y 23306; 6,7 %) compartieron un perfil alélico idéntico que correspondió al ST43, siendo esta ST la única determinada para Ms en este estudio. Las seis muestras restantes (20,0 %) mostraron combinaciones de alelos que, aunque compartían similitudes con perfiles ya observados en las muestras positivas solo para *M. synoviae*, no coincidieron con ningún ST registrado. Adicionalmente, en este grupo se logró obtener ambos perfiles en dos

muestras, 19160 y 22029-5, las cuales tienen una ST5 para el esquema Mg y ST no determinada para Ms.

2.3.6 Árboles filogenéticos de Mg y Ms

A partir de los perfiles alélicos obtenidos mediante MLST, se construyeron árboles filogenéticos independientes para Mg y Ms, con el fin de explorar las relaciones genéticas entre las muestras analizadas. En cada árbol se incluyeron tanto las muestras que resultaron positivas únicamente para cada especie como aquellas del grupo con detección simultánea (Mg–Ms) que lograron completar alguno de los esquemas. Es decir, las muestras del grupo Mg–Ms que cumplieron con el esquema de *M. gallisepticum* fueron incorporadas en el árbol correspondiente a esa especie, y de igual manera se integraron las muestras del mismo grupo que completaron el esquema de *M. synoviae* en el análisis filogenético respectivo. El objetivo de realizar este análisis fue evaluar la posible distribución y agrupación de los perfiles dentro de cada especie.

Para *M. Gallisepticum* se construyeron dos árboles, el primero se realizó con el gen *atpG* el cual fue en el que más alelos se identificaron de todos los *housekeeping*; para este se usaron 21 secuencias de las cuales 17 son de los resultados obtenidos de este estudio con cuatro genes *atpG* de cepas de referencia: cepa R(low), cepa R(high) que son cepas virulentas de la especie y las cepas vacunales 6/85 y cepa K5831 B-19. Un segundo árbol se construyó con los seis genes del esquema concatenados en orden alfabético de todas las muestras del grupo. Para este usaron un total de 19 secuencias, de las cuales 17 son de los resultados obtenidos del esquema MLST y dos cepas vacunales (6/85 y K5831 B-19), en este caso estas dos cepas vacunales permitieron realizar la concatenación completa de los genes del MLST, mientras que las dos cepas R no. Del total de muestras analizadas, 11 (64,7%) corresponden a la ST5 la cual está relacionada con la cepa vacunal F (color lila); 5 (29,4%) corresponden a muestras con ST que no han sido determinadas y la muestra 19022-1 (5,9%) es la ST147 (color azul); las cepas de referencia se encuentran de color negro.

De acuerdo con lo anterior, en ambos árboles hay un origen común de las muestras, las ST5 se agrupan en un clado y las ST nuevas en otro. En el árbol del gen *atpG* las ST5 tienen un origen en común con las cepas R, origen del cual distan las ST nuevas pero que

si tienen uno con las cepas vacunales. En el otro árbol, las cepas tienen una distribución similar, se dividen en los dos grupos y las cepas ST nuevas están relacionadas con las cepas vacunales. Los resultados se pueden observar en la Figura 2-4.

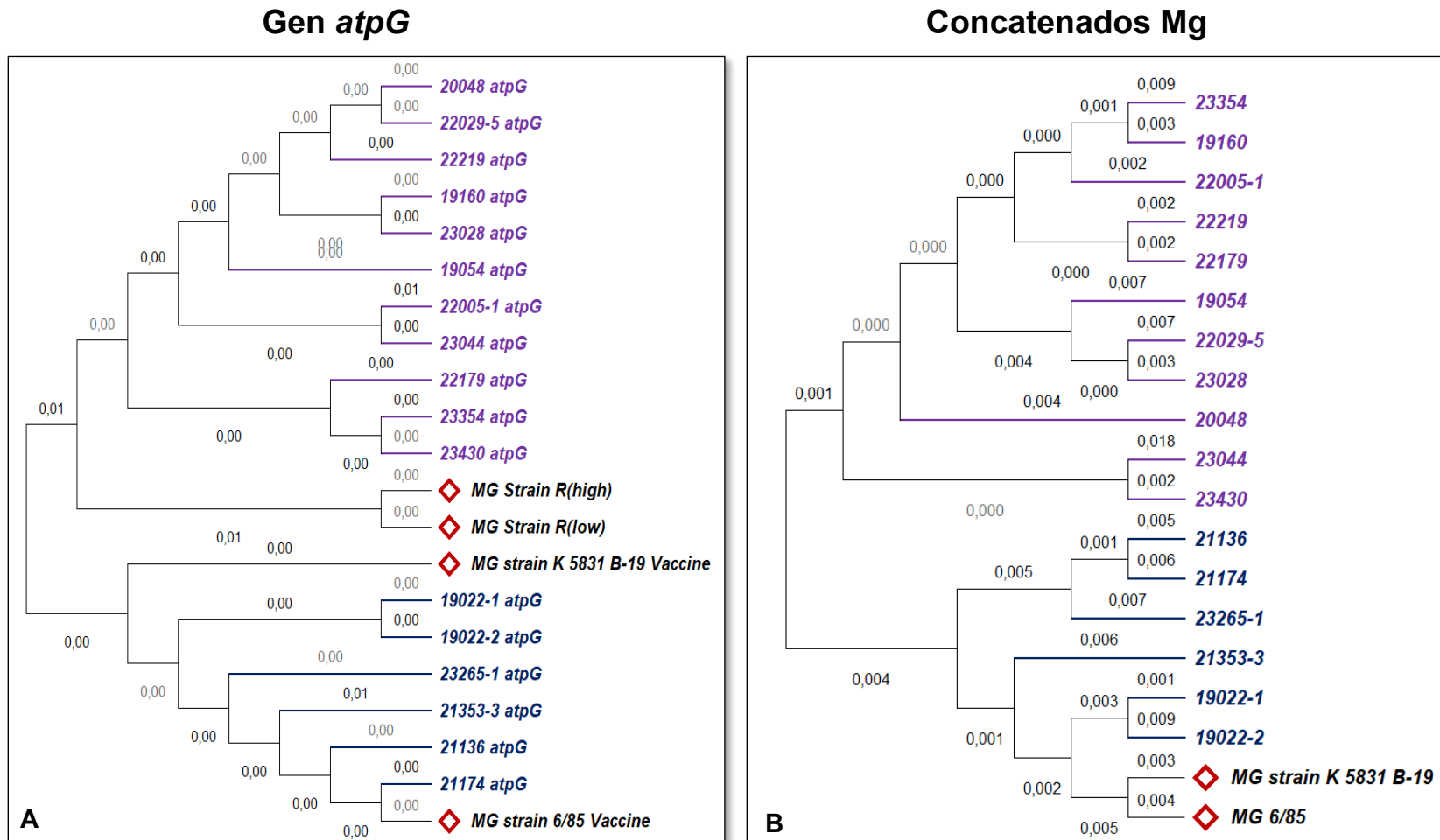


Figura 2-4. Árboles filogenéticos de *Mycoplasma gallisepticum*. — ST5 de la cepa vacunal F. — ST sin determinar y la ST147. ◊ cepas de referencia. **A.** Árbol construido con el gen *atpG* y cuatro cepas de referencia: 6/85 y K5831 vacunales y las virulentas R(low) y R(high). **B.** Árbol construido con los seis genes concatenados y las dos cepas vacunales.

Para la construcción de los árboles filogenéticos de *M. synoviae* se escogieron ocho cepas de referencia donde se encuentra la cepa 53 de Brasil, la cual fue la primera cepa de campo con genoma completo de Ms; la MS-H, de Australia, correspondiente a una cepa vacunal y la cepa de referencia ATCC 25204. Igualmente se incluyeron cepas de aislamientos de dos estudios donde se realizaron esquemas de MLST para Ms: 86079-7NS que es la cepa parental de la vacunal MS-H, la 1968, ULB08/T3, la IT2/A (Kursa et al., 2019) y la IZSVE/3757/D13/2 (Kreizinger et al., 2018), las cuales se encuentran disponibles en el GenBank. El primer árbol se realizó con el gen *nagC* en el cual se identificaron más alelos que en los otros genes *housekeeping* y en el segundo se tuvo en cuenta las secuencias concatenadas en orden alfabético de los siete genes del esquema.

De las muestras de este estudio se incluyeron 19, de las cuales 2 (10,5%), 22268 y 23306, tienen la ST43 relacionada con aislamientos de Europa del Este y las 17 restantes (89,5%) no tiene ST determinada. En el primer árbol, se puede observar un mismo origen de las muestras con dos ramificaciones iniciales; la primera ramificación contiene todas las cepas de referencia, las dos ST43 del estudio y 12 ST ND, mientras que en la otra ramificación se observan las muestras 19118, 23400, 21342-5, 23510 y 23047. Se puede observar una diversidad de cada una de las muestras e incluso en las cepas de referencia.

Por otro lado, en el otro árbol, las agrupaciones son más marcadas, donde se observa nuevamente un origen común con dos ramificaciones. La primera contiene las cepas de referencia, las cuales se agrupan por regiones: un grupo de Australia donde se encuentra la cepa vacunal MS-H, un grupo de Estados Unidos, un grupo de las cepas europeas y la Ms 53 de Brasil. En esta primera ramificación ya no se agrupan tantas muestras, sino solo la mitad 21342-10, 22005-4, 20128-1, 21342-12, 19160 y 21342-5. En la segunda ramificación se encuentran la mayoría de las muestras en contraste con el otro árbol, incluyendo las ST43 que están distantes de las cepas de referencia de Europa. Los resultados se pueden observar en la Figura 2-5.

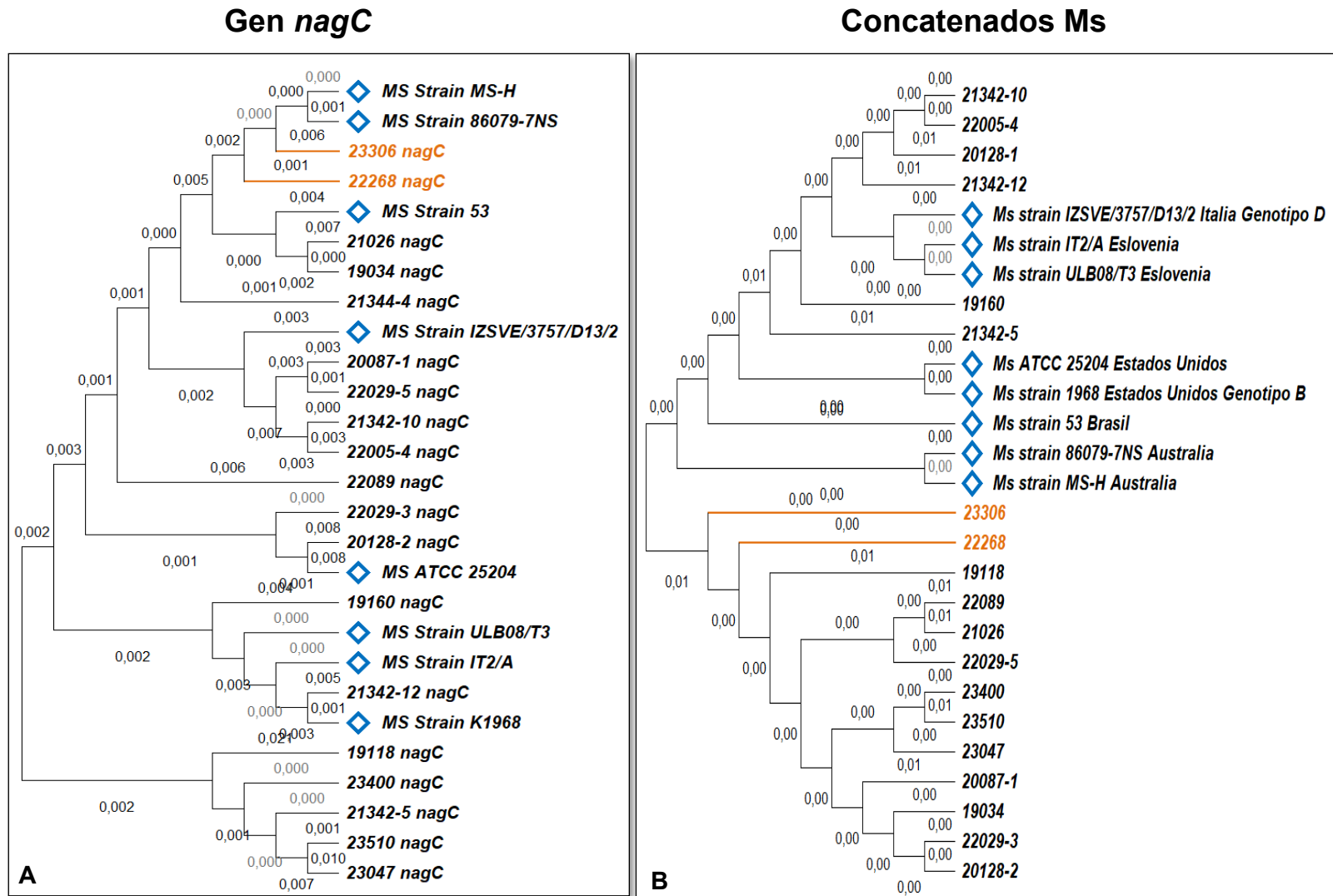


Figura 2-5. Árboles filogenéticos de *Mycoplasma synoviae*. ◆ Cepas de referencia de *M. synoviae*. — ST43. **A.** Árbol filogenético del gen *nagC* con alta diversificación. **B.** Árbol filogenético de las secuencias concatenadas en orden alfabético con agrupaciones marcadas de regiones en las cepas de referencia y otro grupo con la mayoría de las muestras.

2.4 Discusión

Este estudio presenta la primera caracterización por MLST de micoplasmas aviáres en Colombia. Dentro de los resultados obtenidos para Mg, se puede evidenciar que la ST5, asociada a la cepa F vacunal, es frecuente tanto en el grupo con detección única como en el grupo con detección simultánea Mg-Ms. Sin embargo, es importante mencionar que también existen ST ND que no están asociadas ni a la cepa F vacunal ni a las ST asociadas a las cepas ts-11 ni 6/85 que corresponden a la ST56 y ST14, respectivamente (Jolley et al., 2018). Estas nuevas ST sugieren la circulación de cepas de campo junto a las cepas vacunales. Lo anterior podría esperarse teniendo en cuenta que la cepa vacunal F es utilizada con frecuencia dentro del programa de control tanto en aves reproductoras como ponedoras y tiene sentido que haya una alta circulación de la ST5, lo que se relaciona igualmente con su distribución en diferentes departamentos, indicando que los programas de vacunación se realizan a lo largo del país pero, que a pesar de eso existe circulación de otras ST diferentes a las vacunales.

De acuerdo con lo anterior, la circulación de ST ND y la ST147 podría corresponder a cepas de campo presentes en producciones de reproductoras y en menor medida de ponedoras, provenientes en este caso del departamento de Santander. Vale la pena mencionar que debido a la estrategia de muestreo por conveniencia y la disponibilidad en el banco de muestras del Laboratorio de Biología Molecular y Virología de la Universidad Nacional de Colombia esto puede resultar en un sesgo en cuanto al origen y/o distribución de estas. Sin embargo, es importante resaltar que, a pesar de que con la vacunación se busca generar un desplazamiento de las cepas de campo (Ishfaq et al., 2020; ter Veen et al., 2021), los resultados del estudio muestran que hay circulación de genotipos de campo de Mg en esta zona del país. Desafortunadamente, la falta de información respecto a la presencia o no de signos clínicos al momento de la toma de las muestras también es un aspecto para considerar en estudios futuros, de manera que la caracterización de las ST permita inferir su asociación con cuadros de enfermedad en los animales, aportando así a la epidemiología de la enfermedad.

Independientemente de lo anterior, es de resaltar el rango de edades en que se encontraron distribuidas las ST nuevas, desde PIBS hasta las 48 semanas de edad; esto

es importante porque puede representar un factor de riesgo en el control de la micoplasmosis aviar. El hecho de que las ST nuevas se hayan encontrado en PIBS llama la atención en cuanto al control de la enfermedad desde el punto de vista de la transmisión vertical. Esto quiere decir que hubo parentales del tipo de producción de reproductoras infectadas y las cuales dispersaron el patógeno a su progenie. Esto representa un punto crítico que debe analizarse ya que, una de las medidas para evitar la transmisión vertical de la enfermedad, es garantizar que los huevos sean libres de estos patógenos (COBB, 2011; OMSA, 2021). Por lo tanto, se deben implementar estrategias basadas en la aplicación de programas rigurosos de bioseguridad, principalmente en granjas con aves de diferentes edades (Bicout et al., 2017).

Los resultados muestran que la presencia tanto de cepas vacunales como de campo es un posible escenario en las granjas avícolas y por lo tanto debe ser considerado, destacando no obstante que el uso de las vacunas, en especial para *Mycoplasma gallisepticum*, es una herramienta utilizada como una medida que se puede mantener a largo plazo, buscando reducir la severidad de la enfermedad respiratoria, mantener de una manera constante la producción de huevo y reducir la transmisión tanto vertical como horizontal de este microorganismo (Ishfaq et al., 2020).

Respecto a las muestras de Ms, el panorama observado como resultado de este estudio es bien diferente, ya que no se encontró ninguna ST que esté relacionada con alguna cepa vacunal. Por el contrario, más del 90% son de nueva asignación y solo dos (10,5%) coinciden con la ST43, la cual corresponde a un aislamiento de Europa del Este. El hecho de que la mayoría sean ST ND, indica que existe una gran variedad de ST en esta especie circulando en Colombia. Lo anterior puede estar relacionado, posiblemente con que antes del 2012 no se vacunaba contra Ms, permitiendo una alta circulación de cepas de campo y poco control de la transmisión de la enfermedad (Ventura et al., 2012); además, la vacuna en el país se empezó a administrar después del 2016 y posiblemente, la cepa vacunal de Ms no se ha establecido en campo como sí ha ocurrido con la cepa F de Mg. Otro aspecto importante para considerar es la vacunación con MS-H, ya que se ha demostrado que disminuye la transmisión horizontal de cepas de campo entre las aves, no tanto al disminuir los niveles de diseminación, sino al reducir la probabilidad de que la cepa de campo colonice la tráquea. Además, los efectos benéficos de la vacuna ocurren siempre y cuando haya una buena toma vacunal (Dijkman et al., 2017; Feberwee et al., 2009, 2017); lo cual

es desafiante, debido a las características propias de la vacuna, que a diferencia de la cepa F utilizada para el control de Mg, la de *M. synoviae* requiere una temperatura de conservación de -70°C , que al momento de administrarse debe descongelarse entre 33 a 35°C durante 10 minutos y no por más tiempo, para garantizar una titulación de $>10^{5.7}$ unidades de cambio de color (CCU) por ave y evitar contacto con la luz directa (Feberwee et al., 2017; Markham et al., 1998), ya que la cepa de MS-H es termosensible y la vacuna se administra por gota en el ojo del ave (Dijkman et al., 2017).

De acuerdo con lo anterior, es muy posible que exista circulación de genotipos no relacionados con los vacunales y esté ocurriendo en gran parte del país, en aves tanto reproductoras como ponedoras y de diferentes edades, además se debe considerar cómo es el manejo de la vacuna al momento de su administración. En este caso, aunque las muestras no son representativas de lo que ocurre en Colombia y nuevamente, no se pudo comparar la información con datos clínicos, si es claro que *M. synoviae* es diverso en términos de genotipos. Incluso, la identificación de la ST43, la cual corresponde a un aislamiento en pollo de engorde y ponedora de los países europeos Hungría, Rumania y Ucrania (Jolley et al., 2018), identificada en dos muestras de este estudio que no presentan ninguna relación con cepas vacunales es relevante. En este orden de ideas, es importante poder establecer el por qué existe la circulación de este tipo de ST en el país, determinar cómo fue la entrada al territorio e incluso entender su patogenicidad, para lo cual sería necesario el cultivo específico de esta ST y realizar más estudios de genotipificación. Adicionalmente, los perfiles de MLST en PubMLST se empezaron a reportar con mayor frecuencia desde el año 2010 con un pico en el 2021 y de ahí en adelante la cantidad de nuevas ST reportadas ha disminuido (Jolley et al., 2018), por lo tanto, la falta de información no solo es regional sino a nivel global, dificultando así la manera como se entiende el patógeno desde los aspectos moleculares, clínicos y epidemiológicos, mostrando la importancia de los resultados aquí presentados y la necesidad de continuar con este tipo de estudios.

La caracterización de Ms aplicando los esquemas MLST con la tipificación del gen *vlhA* cobra mayor relevancia, teniendo en cuenta que se han podido establecer relaciones entre genogrupos y cuadros clínicos a partir de la región conservada del mismo (M. El-Gazzar et al., 2017). Reconociendo que la caracterización a partir de *vlhA* tiene una limitante ya que las regiones variables del mismo no tienen una relevancia en la tipificación y cepas de

la misma especie pueden estar relacionadas estrechamente, pero ser diferentes en la región conservada de este gen (M. El-Gazzar et al., 2017), se han implementado técnicas como MLST como un complemento a esa caracterización inicial de Ms (Kursa et al., 2019), utilizando diferentes locis que se encuentran distribuidos a lo largo del genoma. Ahora bien, es importante además que toda la caracterización genética se pueda asociar con la presentación de signos clínicos, y así relacionar los fenotipos con los genotipos y determinar genogrupos específicos. Independiente de esto, la información obtenida con los esquemas MLST en este estudio es un aporte en la caracterización inicial de genotipos de micoplasmas circulantes en el país que servirá como base para estudios futuros y que se pueda establecer la existencia o no de la relación entre diferencias a nivel de genotipos y signos clínicos asociados a Micoplasmosis aviar.

Otro aspecto relevante de los resultados presentados es la identificación de muestras que tienen perfiles de Mg y de Ms de manera simultánea. En ambos casos, la ST de Mg corresponde a la número 5, asociada con la cepa vacunal, mientras que las ST de Ms son nuevas y ND. Aunque se trata de pools de muestras, lo que impide afirmar coinfección a nivel individual, estos hallazgos evidencian que, a pesar de la vacunación contra *M. gallisepticum*, *M. synoviae* también está presente en las granjas avícolas, incluso en sistemas de producción tecnificados como el de reproductoras. Este escenario subraya la importancia de fortalecer los programas de vigilancia, monitoreo y bioseguridad, para ambos agentes.

Estos hallazgos resaltan la presencia de perfiles alélicos repetidos en diferentes tipos de muestras; así mismo, también muestran la existencia de combinaciones no documentadas previamente según los datos disponible en la base de datos PubMLST, lo que refuerza la importancia de ampliar y actualizar la información existente para mejorar la caracterización de microorganismos por medio de la técnica del MLST en estudios sobre *Mycoplasma* spp.

Los árboles filogenéticos construidos a partir de la concatenación de los genes incluidos en los esquemas MLST permitieron visualizar con mayor claridad las relaciones genéticas entre las muestras analizadas y aportaron evidencia que complementa los hallazgos observados en las tablas de perfiles alélicos. Esta separación filogenética sugiere la presencia de genotipos distintos, los cuales corresponden a cepas de campo circulantes en el país. Para *Mycoplasma gallisepticum*, se observaron dos agrupaciones bien

definidas: la primera correspondiente a las muestras clasificadas como ST5 que corresponde a la cepa vacunal y que se agruparon de manera homogénea. El otro grupo bien definido estuvo conformado por aquellas muestras con combinaciones alélicas no determinadas o nuevas, que formaron un clado independiente del vacunal de la cepa F pero que mostraron relación entre ellas y con las cepas vacunales 6/85 y K5831.

Estas cepas corresponden a vacunas vivas atenuadas (Raviv et al., 2008) y aunque están relacionadas con las ST nuevas de Mg, no corresponden a cepas vacunales según la base de datos PubMLST, ya que para la cepa vacunal 6/85 su ST es la número 14 y para la K5831 corresponde la ST57 y aunque la cepa ts-11 no se incluyó en el árbol filogenético, su correspondiente ST es la número 49. (Jolley et al., 2018). Por lo tanto, las ST ND no son vacunales, a pesar de ser cercanas a la 6/85 principalmente y se confirma que son cepas de campo, con transmisión vertical, teniendo implicaciones como la persistencia del agente en la cadena de producción, diseminación de este a diferentes regiones geográficas y reduce la efectividad de las medidas de control, como podría ser el caso de la muestra 21136.

En el caso de *Mycoplasma synoviae*, el panorama filogenético fue diverso ya que las muestras son diferentes entre ellas mismas e incluso con las cepas de referencia por lo que se pudo observar en el árbol de *nagC*. Por otro lado, en el árbol con las secuencias concatenadas las dos ramificaciones principales agrupan las cepas de referencia en una sola y la otra corresponde a ST ND y las ST43; estas últimas tienen un origen en común pero aun así son diferentes entre ellas y no se agrupan con las cepas de referencia de Europa. Las muestras con ST ND se distribuyeron de forma menos estructurada, conformando agrupaciones débiles o ramas independientes, lo cual indica una mayor diversidad genética dentro del grupo analizado (Kursa et al., 2019). Este patrón puede explicarse primero porque solo se realizó caracterización por MLST y no fue posible realizar el proceso en tándem con el gen *vlhA* de las muestras analizadas, como se recomienda en otros estudios, lo cual permitiría relacionar las ST con los genotipos previamente reportados. (M. El-Gazzar et al., 2017; M. M. El-Gazzar et al., 2012; Kursa et al., 2019). Adicionalmente, como la vacuna retrasa, pero no previene completamente, la colonización de cepas de campo es posible que la alta variabilidad sea por una mayor circulación de cepas de campo y que la sola vacunación no aporte completamente al control de la enfermedad (Feberwee et al., 2017). Además, ninguna de las ST ND está

relacionada con la cepa vacunal MS-H la cual corresponde a la ST2 en PubMLST (Jolley et al., 2018). Teniendo en cuenta lo anterior, se puede sugerir que la vacuna no desplaza cepas de campo y, por lo tanto, esto permite que su circulación sea alta y diversa. Por consiguiente, *M. synoviae* debe tener un monitoreo riguroso tanto para el seguimiento vacunal como de la caracterización de la especie.

En conjunto, los resultados de este estudio son las primeras caracterizaciones moleculares de micoplasmas aviáres en el país, en donde estos análisis genéticos, así como los de los análisis filogenéticos, no solo respaldan los hallazgos obtenidos mediante la asignación de perfiles alélicos, sino que también refuerzan la necesidad de continuar con la genotipificación de *Mycoplasma* spp. en Colombia y asociarla con la sintomatología clínica de la enfermedad para entender mejor la dinámica de la misma y aplicarlo en estrategias de control eficientes y efectivas. Para esto, es necesario avanzar en estudios que tengan un número de muestras representativo, incluyendo aves enfermas y aves vacunadas aparentemente sanas, que provengan de diferentes regiones de Colombia y que incluyan no solo las producciones tecnificadas, sino también aves de traspatio, con el fin de esclarecer su papel en la eco-epidemiología ya que éstas se han relacionado con la transmisión de la enfermedad. La obtención de esta información permitiría la identificación de clados únicos, particularmente aquellos alejados de las cepas vacunales, representando cepas de interés que permitan comprender mejor la dinámica de transmisión, la eficacia de las medidas de control y las posibles rutas de diseminación de estas. Además, la incorporación de estas secuencias a bases de datos públicas como PubMLST contribuirá a mejorar la representatividad geográfica de los genotipos reportados, lo cual servirá también como criterio de selección de las vacunas a utilizar, siendo esto fundamental para fortalecer la vigilancia molecular y establecer estrategias de control más robustas a nivel nacional

3. Capítulo 3: Circulación de genotipos de RAM en micoplasmas aviares en Colombia

3.1 Introducción

El tratamiento antimicrobiano puede ser útil y beneficioso cuando se presentan signos clínicos tanto de *Mycoplasma gallisepticum* como de *M. synoviae*, pero siempre teniendo en cuenta que el uso prolongado de antimicrobianos puede conducir a la aparición de RAM. Los antimicrobianos considerados eficaces contra los micoplasmas, y por lo tanto los más utilizados, son las tetraciclinas, los macrólidos, las pleuromutilinas y las fluoroquinolonas. (Bottinelli et al., 2022; A. V. Gautier-Bouchardon, 2018; Giles & Yavari, 1994). La RAM representa una preocupación creciente para la salud aviar, especialmente en contextos de producción intensiva donde el uso de antibióticos es frecuente.

Dentro de las estrategias para mitigar esta problemática se encuentra realizar terapias antibióticas junto con la realización de antibiogramas que respalden el uso de un antibiótico sobre otro con el fin de garantizar una buena respuesta de los animales frente a la enfermedad y evitando el riesgo de presentar RAM. Sin embargo, parte del problema es que para el desarrollo de pruebas de sensibilidad a antibióticos requieren ser cultivados, lo cual resulta lento y costoso, debido a los requerimientos nutricionales para su crecimiento (Razin, 1992; Razin et al., 1998). El grupo de antimicrobianos fluoroquinolonas, al cual pertenece la enrofloxacin, incluye compuestos que se absorben bien por vía oral, penetran prácticamente en todos los tejidos y células del cuerpo, y exhiben un efecto bactericida dependiente de la concentración cuando se administran en dosis adecuadas (Drlica & Malik, 2003). Esta última característica lleva a suponer que las fluoroquinolonas tendrían el beneficio de prevenir la aparición de RAM, especialmente si las terapias se basan en datos de MIC (concentración mínima inhibitoria). Sin embargo, la

resistencia a las fluoroquinolonas se detecta con frecuencia en bacterias aisladas de animales al punto que ciertos compuestos han sido retirados del mercado en algunos países (Gautier-Bouchardon, 2018).

Las fluoroquinolonas son antibióticos de amplio espectro que se han utilizado en veterinaria aproximadamente desde la década de 1990 (Bhatt & Chatterjee, 2022; Ferguson-Noel, 2013; OMSA, 2021) y hacen parte de los antibióticos de elección para aquellas bacterias que carecen de pared celular debido a que tienen como objetivo interrumpir la producción de proteínas bacterianas, teniendo como objetivos diana la ADN girasa y la Topoisomerasa IV, codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB* para la primera enzima y *parC* y *parE* para la segunda (Drlica & Malik, 2003; Hooper, 2001; Hooper & Jacoby, 2016).

Las topoisomerasas de ADN micoplásmicas son la ADN girasa y la topoisomerasa IV, ambas pertenecientes al tipo II de topoisomerasas. Estas enzimas micoplásmicas se parecen a sus homólogas eubacterianas, en que tienen una estructura compuesta por dos subunidades: A y B en el caso de la ADN girasa y los productos de los genes *parC* y *parE* en el caso de la topoisomerasa IV. El rol que desempeñan es catalizar las interconversiones de los isómeros topológicos de las moléculas de ADN, siendo esenciales en la replicación, transcripción, recombinación y reparación.

La ADN girasa introduce superenrollamientos negativos en las moléculas de ADN circular cerrada en una reacción que requiere ATP. En ausencia de ATP, la girasa puede relajar el ADN superenrollado negativamente. La topoisomerasa IV se parece a la ADN girasa en su efecto sobre el ADN, pero carece de la actividad de relajación independiente del ATP. Las enzimas micoplasmáticas son inhibidas por las quinolonas (Otero et al., 2001a; Razin et al., 1998) y la aparición de resistencia a las fluoroquinolonas se debe principalmente a mutaciones en genes que codifican las subunidades de las enzimas diana del antibiótico (Hooper & Jacoby, 2016; Lysnyansky et al., 2013). De hecho, es precisamente el mecanismo de acción de estos fármacos lo que incrementa la frecuencia global de mutaciones en el ADN bacteriano, lo cual, en teoría, generaría mutaciones recesivas (Drlica & Malik, 2003).

El mecanismo de resistencia a las quinolonas de *Mycoplasma* sp. consiste en mutaciones puntuales, las cuales son alteraciones de las regiones determinantes QRDR de los genes

gyrA y *gyrB* y los genes *parC* y *parE* (Redgrave et al., 2014). Un ejemplo son las sustituciones Ser83- Arg en GyrA y Ser80-Leu / Trp en ParC, las cuales demostraron tener el mayor impacto en la resistencia a las fluoroquinolonas de Mg. Mientras que, para Ms, la reducción de susceptibilidad a la enrofloxacin está asociada con sustituciones de aminoácidos en el ParC QRDR (Bekő et al., 2020; Lysnyansky et al., 2013; Redgrave et al., 2014).

El seguimiento del uso de fluoroquinolonas en los Micoplasmas aviáres no solo es importante para la enfermedad como tal. También hay que tener en cuenta que la liberación de residuos antibióticos al ambiente contribuye al problema de RAM, favorecido por la transferencia horizontal de genes entre las bacterias (Bahl, 2009; Bhatt & Chatterjee, 2022). En general, las aves comerciales tienen una buena absorción y distribución de las quinolonas; sin embargo, son metabolizadas parcialmente por el hígado debido al poco efecto de primer paso (Otero et al., 2001b). Por lo tanto, se considera que el 70% de estos antibióticos se elimina por las heces de las aves y en los demás animales también por la orina, llegando al ambiente como componentes bioactivos que pueden promover la resistencia en diversas bacterias patógenas o poblaciones microbianas, representando una preocupación para la salud tanto de humanos como de animales (Kristiansson et al., 2011).

Con base en lo anterior, el objetivo de este capítulo fue identificar los genes y sus mutaciones asociadas con la resistencia a fluoroquinolonas en detecciones moleculares de Mg y Ms obtenidas de granjas avícolas y determinar su respectiva frecuencia de presentación, para realizar el primer tamizaje respecto al panorama de RAM de micoplasmas frente a estos antibióticos.

3.2 Materiales y métodos

Una vez establecidos los perfiles de MLST se realizó la detección de los genes ribosomales *gyrA* y *parC* asociados con resistencia a fluoroquinolonas, tanto para Mg como para Ms (Lysnyansky et al., 2008, 2013). Los primers empleados para la identificación de los genes de interés están listados en la Tabla 3-1.

Tabla 3-1: Primers usados en la detección de genotipos de resistencia para *gyrA* y *parC* en detecciones de Mg y Ms.

Gen	Primer	Secuencia (5'→3')	Tamaño (bp)	Reference
<i>gyrA</i>	<i>gyrA</i> -Mg-F	GAGCTAGAAACATCATTTCATGG	485	(Lysnyansky et al., 2008)
	<i>gyrA</i> -Mg-R	CCTACAGCAATACCACTTGAA		
<i>parC</i>	<i>parC</i> -Mg-F	GATCTTGATGATATCATGTCCAC	485	
	<i>parC</i> -Mg-R	CCAGTTGAACCATTAACGAGT		
<i>gyrA</i>	<i>gyrA</i> -Ms-F	GAAGATCAGCCTGAATTAGTT	494	(Lysnyansky et al., 2013)
	<i>gyrA</i> -Ms-R	GCCATTCTAGCTTCGGTATAA		
<i>parC</i>	<i>parC</i> -Ms-F	CCAACCGTGCAATTCCTGAT	469	
	<i>parC</i> -Ms-R	TTATGCGGCGGCATTTCCG		

Para las reacciones de amplificación del ADN se utilizó la enzima GoTaq® Green MasterMix, en un volumen final de 10 µL que contenía: 5 µL de la mastermix, 0,5 µL de cada primer para cada gen, 3 µL de agua ultrapura y 1 µL de ADN de la muestra. Las condiciones de PCR utilizadas fueron específicas para cada gen. Para *gyrA*-Mg fue una desnaturalización inicial por 3 minutos a 95°C, 30 ciclos de desnaturalización por 30 segundo a 95°C, anillamiento por 30 segundos a 56°C (*gyrA*) y 52°C (*parC*) y una extensión de 45 segundos a 72°C. Finalmente otra extensión por 10 min a 72°C (Lysnyansky et al., 2008). Para los genes de Ms las condiciones fueron: una desnaturalización inicial por 3 minutos a 95°C, 30 ciclos de desnaturalización por 30 segundo a 95°C, anillamiento por 30 segundos a 56°C (*gyrA*) y 60°C (*parC*) y una extensión de 45 segundos a 72°C. Finalmente otra extensión por 5 min a 72°C (Lysnyansky et al., 2013).

Para las PCR tanto de Mg como Ms se utilizó un termociclador C1000 (Bio-Rad, Hercules, California, EE. UU). Los productos de PCR fueron revelados en gel de agarosa al 1,5%; donde se emplearon 0.2 µl del buffer de carga EZ VISION® (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EE. UU.) y 2 µl de marcador de peso molecular GeneRuler 100 pb (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, EE. UU.) y las imágenes se obtuvieron mediante el fotodocumentador GelDocXR® (Bio-Rad, Hercules, California, EE. UU.) junto con el software Quantity One Analysis 1-D 4.6.3 ® (Bio-Rad, Hercules, California, EE. UU.).

Para la secuenciación de ADN se realizó primero un proceso de purificación utilizando

acetato de amonio y etanol absoluto al 80%; la precipitación de ADN se llevó a cabo mediante una serie de ciclos de centrifugaciones; el primero durante 30 minutos a 10000 rpm, seguido por dos ciclos a 12000 rpm durante 10 minutos cada uno. Posteriormente, se eluyeron las muestras con agua de grado molecular, se cuantificó el DNA purificado y se ajustó a la concentración de 7 ng/μL para cada reacción con sus respectivos primers forward y reverse. La secuenciación se llevó a cabo en el Instituto de Genética de la UNAL, utilizando el método de Sanger. Las secuencias obtenidas fueron analizadas utilizando herramientas bioinformáticas como MultAlin (Corpet, 1988), Chromas 2.6.6 (Technelysium Pty Ltd., 2019) y Unipro UGENE (Okonechnikov et al., 2012).

A partir de un alineamiento múltiple de secuencias se identificaron las posiciones de aminoácidos en los QRDR que están relacionadas con cambios asociados a RAM. Para este estudio se tuvo en cuenta que la muestra tuviera el esquema MLST completa ya sea para Mg o para Ms. Como cepas de referencia se tuvo en cuenta las secuencias parciales de *gyrA* de la subunidad A de la ADN girasa y *parC* de la Topoisomerasa IV de la cepa R(low) ([AAP57073.1](#) y [AAP56769.2](#)) para Mg y de igual manera las secuencias parciales de los mismos genes de las cepas MS53 ([AAZ43730.1](#) y [AAZ43478.1](#)) y MS-H ([WP_109537073.1](#) y [WP_109536917.1](#)) para Ms.

3.3 Resultados

3.3.1 Detección de genes asociados con resistencia a fluoroquinolonas

De las 34 muestras a las que se les estableció el perfil de MLST, se realizó la identificación de genes de resistencia *gyrA* y *parC* en 14 muestras (41,2%) de las cuales 50% se les identificó genes de Mg y al otro 50% los de Ms. De las siete muestras de Mg, el 15% (n=6) son reproductoras y una muestra (25%) de ponedoras. La procedencia se distribuyó de la siguiente manera: el 42,9% (n=3) fue de Santander, el 28,6% de Cundinamarca (n=2), una del Huila y otra de Valle del Cauca cada uno con representación del 14,25%. La edad entre las reproductoras fue entre Pibs (1d) y 48 semanas y de la ponedora fue 24 semanas. Las detecciones de estos genes se pueden observar en la Figura 3-1.

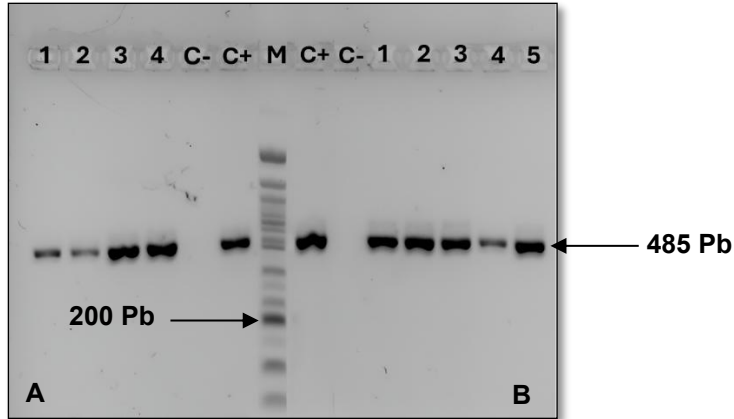


Figura 3-1. Detecciones de los genes *gyrA* y *parC* de muestras con esquema completo MLST de Mg. **A.** Lado izquierdo de la figura representa el gen *gyrA*. **B** Lado derecho de la figura representa el gen *parC*. Ambos genes tienen un tamaño de 485 Pb. **M.** Marcador de peso molecular de 50 Pb. **C+** Vacuna 6/85. **C-**. Agua ultrapura.

Para el grupo de Ms, el 57,1% (n=4) fue de reproductoras entre las 36 y 78 semanas de edad, mientras que las ponedoras tuvieron una representación del 42,9% (n=3) con edades entre las 48 y 59 semanas. La mayoría de las muestras fueron del departamento de Santander con un 42,9% (n=3), seguido de Cundinamarca con un 28,6% (n=2) y finalmente Boyacá y Tolima cada uno con una muestra que representa el 14,25% respectivamente. Las detecciones de estos genes se pueden observar en la Figura 3-2.

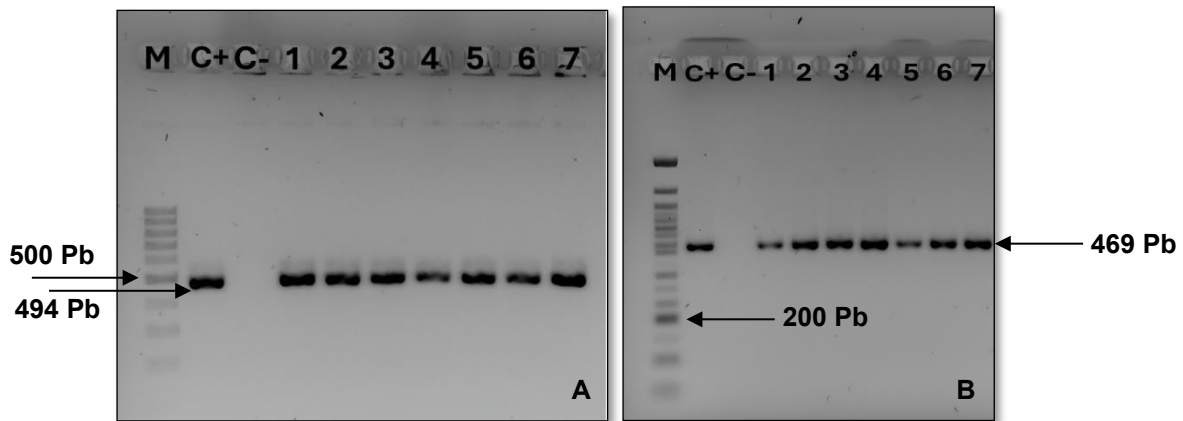


Figura 3-2. Detecciones de los genes *gyrA* y *parC* de muestras con esquema completo MLST de Ms. **A.** Lado izquierdo de la figura representa el gen *gyrA* con un tamaño de 494 Pb. **B** Lado derecho de la figura representa el gen *parC* con un tamaño de 469Pb. **M.** Marcador de peso molecular de 50 Pb. **C+** Vacuna MS-H. **C-**. Agua ultrapura.

3.3.2 Análisis bioinformático de detecciones de genotipos de RAM

El análisis bioinformático de los genes asociados a RAM, permite establecer un tamizaje inicial de los genotipos circulantes en el país. Por lo tanto, este es el primer estudio con identificación de genotipos con cambios de aminoácidos en *gyrA* y *parC* de micoplasmas aviares en Colombia.

De las muestras del grupo de genes de Mg, siete muestras (50%) fueron analizadas en los QDRD GyrA y ParC; en la posición 59 se evidencian cambios con respecto a la cepa de referencia ADN girasa subunidad A cepa R (low) ([AAP57073.1](#)) la cual corresponde una cepa virulenta de Ms. En el estudio, cuatro muestras, 23044 (MG-3), 20048 (MG-6), 23354 (MG-8) y 19160 (MG-11) cambian una Hys por una Tyr. Otro cambio de aminoácido evidenciado fue en la posición 83, una Ser por Ile en tres muestras, 21136 (MG-2), 19022-1 (MG-5) y 19022-2 (MG-13) (**Figura 3-3**). En las posiciones 58 y 84, que también están relacionadas con un aumento en los MIC de fluoroquinolonas, ninguna de las muestras evidenció algún cambio asociado con RAM.

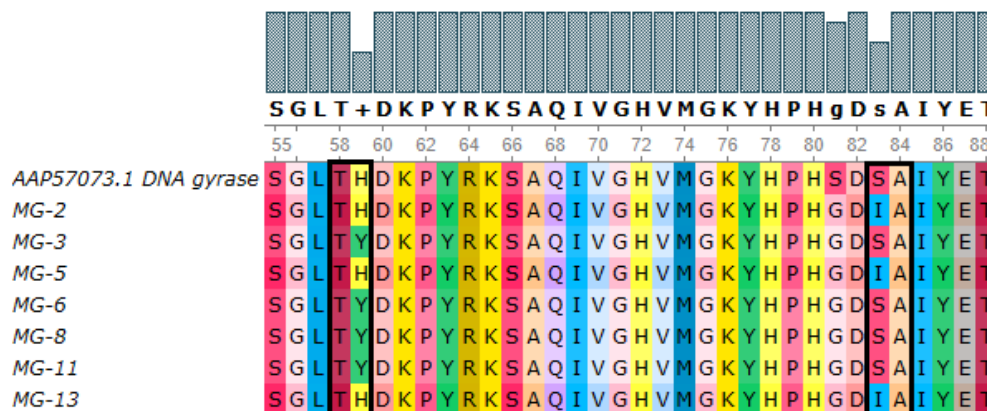


Figura 3-3. Mutaciones asociadas a *gyrA* en *M. gallisepticum*. Cambios de aminoácidos en las posiciones 59 y 83 del gen *gyrA* de Mg; Hys-59-Tyr en las muestras MG-3, MG-6, MG-8 y MG-11 y Ser-83-Ile en MG-2, MG-5 y MG-13.

Respecto a *parC*, el cambio de aminoácido fue en la posición 80, Ser-80-Leu en las muestras 21136 (MG-2), 23044 (MG-3), 19022-1 (MG-5) y 19022-2 (MG-13) con respecto a la cepa de referencia DNA topoisomerasa IV subunidad A cepa R (low) ([AAP56769.2](#)) (**Figura 3-2**), que corresponde a aumentos MIC de hasta 8 veces en otros estudios. Las

muestras 21136, 19022-1 y 19022-2 presentan cambios de aminoácidos tanto en *gyrA* como en *parC*,

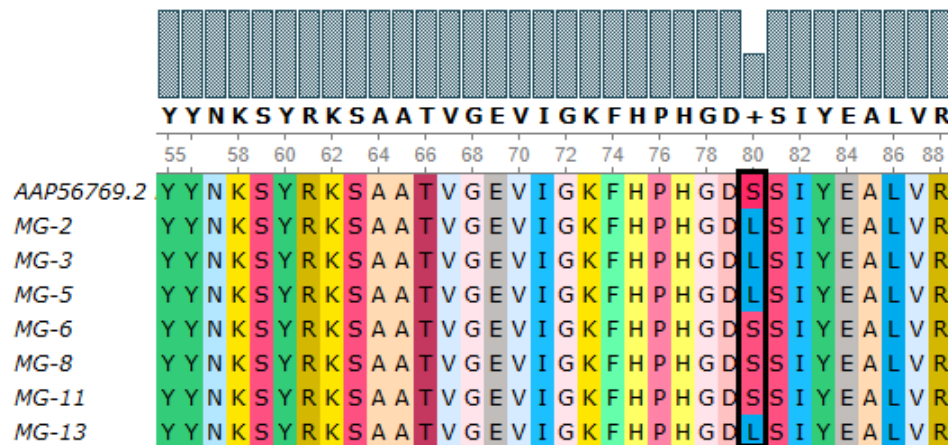


Figura 3-4. Mutaciones en *parC* asociadas a RAM en *M. gallisepticum*. Cambios de aminoácidos en la posición 80 de *parC* de Mg; Ser-80-Leu en las muestras MG-2, MG-3, MG-5 y MG-13.

Para las muestras de los grupos Ms, en *gyrA* no hubo cambios que indicaran mutaciones asociadas a RAM en la posición 87, donde un cambio de Ser por Asn podría estar relacionada con el problema. Además, se realizó el alineamiento múltiple con el gen DNA girasa subunidad A de una cepa vacunal MS-H ([WP_109537073.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/WP_109537073.1)) y con la cepa 53 correspondiente a un aislamiento de pollo ([AAZ43730.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AAZ43730.1)), sin obtener evidencia de mutaciones asociadas con RAM (**Figura 3-5**).



Figura 3-5. Mutaciones asociadas a *gyrA* en *M. synoviae*. No hay evidencia de cambios en el gen *gyrA* de Ms en ninguna muestra.

Respecto a *parC* en la posición 80 se evidencia el cambio de Thr por Ile de las muestras 21342-5 (MS-1), 21342-12 (MS-4), 21026 (MS-5), 20087-1 (MS-8) y 21342-10 (MS-11) y en la 84, la cepa de referencia 53 ([AAZ43478.1](#)), la cual es la misma de *gyrA*, tiene la mutación que es Asp por Asn; esta mutación no se encuentra en la cepa vacunal MS-H ([WP_109536917.1](#)) ni en ninguna de las muestras del estudio (**Figura 3-6**)

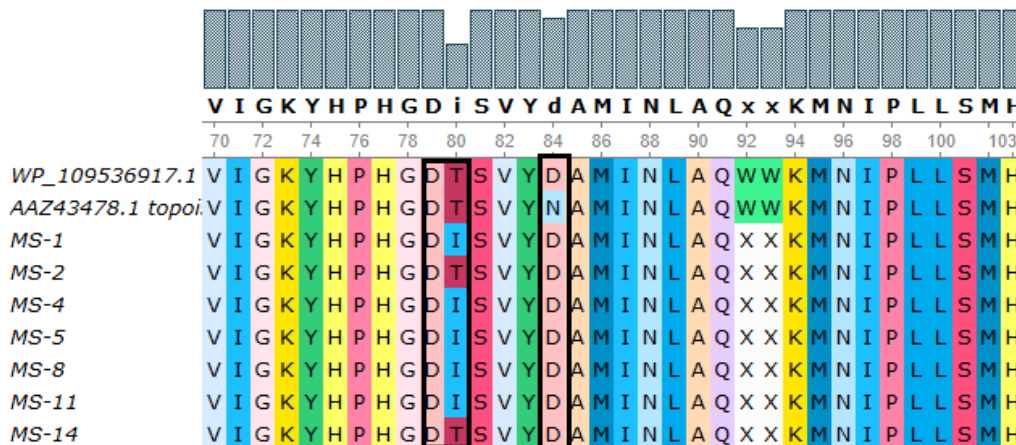


Figura 3-6 Mutaciones en *parC* asociadas a RAM en *M. synoviae*. Cambio de aminoácidos del gen *parC* en la posición 80 de Thr por Ile de las muestras MS-1, MS-4, MS-5, MS-8 y MS-11. En la posición 84, la cepa de referencia 53 presenta el cambio Asp por Asn; esta sustitución no se encuentra en la cepa vacunal MS-H.

Teniendo en cuenta los anteriores resultados, en la Tabla 3-2 se resumen los cambios aminoácidos en cada uno de los respectivos genes identificados junto con la frecuencia de presentación tanto en Mg como en Ms.

Tabla 3-2 Cambios en aminoácidos en los genes *gyrA* y *parC* de *Mycoplasma gallisepticum* y *M. synoviae*.

Especie	Gen	Cambio de AA	Posición	Frecuencia (n/N)	Frecuencia (%)
Mg	<i>gyrA</i>	Hys → Tyr	59	4/7	57.1%
		Ser → Ile	83	3/7	42.9%
	<i>parC</i>	Ser → Leu	80	4/7	57.1%
	<i>gyrA</i>	No hay mutaciones	—	0/7	0%
Ms	<i>parC</i>	Thr → Ile	80	5/7	71.4%
		Asp → Asn (solo en cepa ref. 53)	84	0/7	0%

*n: número de muestras N: Total de muestras AA: Aminoácidos

3.4 Discusión

El mecanismo de RAM de *Mycoplasma* sp. a las quinolonas de consiste en mutaciones puntuales, las cuales son alteraciones de las regiones determinantes QRDR de los genes *gyrA* y *gyrB* y los genes *parC* y *parE* (Redgrave et al., 2014). Las sustituciones de aminoácido en posiciones específicas de *gyrA* y *parC* tienen un gran impacto en la resistencia de Mg a las fluoroquinolonas. Mientras que, para Ms, la reducción de susceptibilidad a la enrofloxacin está asociada con sustituciones de aminoácidos en el ParC QRDR (Bekó et al., 2020; Lysnyansky et al., 2013; Redgrave et al., 2014).

En *Mycoplasma gallisepticum*, las mutaciones más comúnmente asociadas con resistencia son Ser83→Arg en *gyrA* y Ser80→Leu/Trp en *parC* (Lysnyansky et al., 2012). En este estudio se identificaron mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* en siete muestras del grupo Mg. Se evidencian muestras que presentaron el cambio Ser83→Ile, el cual ha sido ampliamente reportado como un marcador de resistencia, especialmente frente a enrofloxacin en el gen de *gyrA* (A. V. Gautier-Bouchardon, 2018; Lysnyansky et al., 2008). En el análisis del gen *parC*, se identificó la mutación Ser80→Leu en las mismas muestras (21136, 19022-1 y 19022-2). Esta sustitución ha sido reportada como responsable de un aumento de hasta ocho veces en el MIC frente a fluoroquinolonas (A. V. Gautier-Bouchardon, 2018; Lysnyansky et al., 2008). Un detalle importante de estas muestras de Mg es que son ST de nueva designación incluida la ST147, lo que quiere decir que hay circulación de genotipos de resistencia en cepas de campo de *Mycoplasma gallisepticum* y se encuentran en el departamento de Santander, siendo todas del tipo de producción de reproductoras. Las edades de estas muestras corresponden a Pibs y entre 46 y 48 semanas. Por lo tanto, esto es un panorama preocupante ya que son genotipos que se transmiten de manera vertical, desde el oviducto al huevo y en consecuencia son pollitos que, si nacen representarán un problema para la producción, no solo por ser una fuente de dispersión del micoplasma, sino que además con el riesgo de no responder a un tratamiento antibiótico en caso de enfermarse. Además, se debe tener en cuenta la transmisión horizontal por aves que posiblemente están enfermas, con el mismo riesgo de ser resistentes a las fluoroquinolonas (Mugunthan et al., 2023b; Roberts & McDaniel, 1967).

De todas maneras, se debe relacionar estas ST con la presentación de signos clínicos y realizar pruebas de sensibilidad a antibióticos en las cepas que se puedan aislar. Aunque el cultivo es lento, los hallazgos de este estudio deberían compararse con información de fenotipos circulantes en la avicultura del país. Lo anterior se debe considerar porque la presencia de múltiples mutaciones en ambos genes suele ser necesaria para conferir resistencia clínicamente significativa a fluoroquinolonas (A. V. Gautier-Bouchardon, 2018). También tener en cuenta que en *gyrA*, aunque no se observaron cambios en la posición 58 ni en la posición 84, de presentarse cambios como 58-Thr/Ile y 84-Ala/Pro, incrementarían la resistencia a las fluoroquinolonas de entre dos a cuatro veces el MIC (Lysnyansky et al., 2008; Reinhardt et al., 2002), por lo tanto, se debe realizar monitoreos constantes tanto de genotipo como de fenotipo para seguir el comportamiento de Mg en cuanto a la RAM.

Por otro lado, ninguna de las muestras analizadas mostró el cambio Ser83→Arg, que también se ha vinculado con resistencia (Zhang et al., 2018). Adicionalmente, en la posición 59, se presentó una sustitución de histidina por tirosina (Hys59→Tyr), aunque esta mutación ha sido descrita previamente, estudios *in vitro* no han asociado consistentemente este cambio con un aumento en el MIC, e incluso se ha vinculado con sensibilidad a la enrofloxacin (A. V. Gautier-Bouchardon, 2018; Lysnyansky et al., 2008). En los datos analizados, las que presentaron este último cambio de aminoácidos, corresponden a ST5, es decir cepas vacunales y, por lo tanto, tiene sentido que no presenten mutaciones asociadas a RAM.

En el caso de *Mycoplasma synoviae*, se ha sugerido que el gen *parC* es el principal marcador de resistencia a enrofloxacin, aunque *gyrA* también se secuenció para detectar mutaciones menos frecuentes (Bekó et al., 2020; Lysnyansky et al., 2013). En este estudio, no se identificaron mutaciones en *gyrA*, incluyendo la posición 87 (Asn→Ser/Lys), que ha sido asociada con incrementos moderados en MIC (A. V. Gautier-Bouchardon, 2018), ni en las posiciones 58, 59 o 83. Por el contrario, en *parC*, en cinco (71,4%) de siete muestras estas se encontró la sustitución en la posición 80 (Thr80→Ile), un cambio previamente asociado con disminución en la susceptibilidad a fluoroquinolonas (Lysnyansky et al., 2013). Estas muestras corresponden en su mayoría al departamento de Cundinamarca (n=3, 60%) seguido de Boyacá (n=1, 20%) y Tolima (n=1, 20%); en cada uno de estos departamentos tres muestras corresponden a reproductoras mientras que de ponedoras

solo se encuentran en Cundinamarca; finalmente, las edades para las reproductoras fueron entre 36 y 78 semanas y de ponedoras entre 59 a 78 semanas. Teniendo en cuenta lo anterior, estas muestras corresponden a ST no determinadas previa y posiblemente, corresponden a cepas de campo circulantes.

No se observaron cambios en las posiciones 79, 81 ni 84 los cuales también son sitios en donde se han reportados cambios de aminoácidos asociados a RAM. En los datos se resalta que la mutación Asp84→Asn, se identificó en la cepa de referencia MS 53, la cual corresponde a un aislamiento de pollos de engorde en Brasil (Vasconcelos et al., 2005); sin embargo, este cambio no se encontró en las muestras evaluadas ni en la cepa vacunal MS-H. El reporte de este cambio de aminoácidos se ha relacionado con un aumento de MIC de hasta 4 veces en aislamientos clínicos (A. V. Gautier-Bouchardon, 2018; Lysnyansky et al., 2013).

Considerando que en *M. synoviae* una única mutación en *parC* puede ser suficiente para alterar la susceptibilidad a fluoroquinolonas, las cinco muestras que presentaron el cambio Thr80→Ile y que además corresponden a STs ND previamente, también da un indicador de cepas de campo, todas diferentes entre que tiene genotipos de resistencia y que están circulando en el territorio colombiano, en departamentos cercanos entre sí como lo son Cundinamarca, Tolima y Boyacá. Así como se realizan las recomendaciones con Mg, es importante poder cultivar el patógeno para las pruebas de sensibilidad y relacionar esta presentación de genotipos con fenotipos. Adicionalmente, tener en cuenta que esta información debe ir acompañada del reporte de signos clínicos de los animales. Esto refuerza la necesidad de continuar fortaleciendo los estudios epidemiológicos moleculares en Colombia, no solo para caracterizar la diversidad genética de estos agentes, sino también para monitorear tempranamente la aparición de fenotipos asociados a RAM.

A pesar de que en este estudio se identificaron mutaciones puntuales en regiones codificantes de *gyrA* y *parC* asociadas con resistencia a fluoroquinolonas, es importante tener en cuenta que los mecanismos de resistencia en micoplasmas no siempre se explican exclusivamente por estos cambios genéticos. En algunos casos, no se detectan mutaciones, lo que sugiere la posible existencia de mecanismos aún no caracterizados. Por ejemplo, en la literatura se han descrito dos mecanismos de resistencia a las fluoroquinolonas: la alteración de los genes que codifican para la ADN girasa y la

topoisomerasa IV, que son los blancos moleculares de esta clase de antibióticos, o la reducción en la acumulación de quinolonas mediante bombas de eflujo (A. V. Gautier-Bouchardon et al., 2002). Esto resalta la limitación de utilizar únicamente el tamizaje molecular como herramienta para la detección de RAM en *Mycoplasma* spp. (Bottinelli et al., 2022). Sin embargo, los hallazgos moleculares deben ser parte del análisis de la información ya que sirven como un primer cribado del riesgo de RAM. Adicionalmente, la ausencia de criterios estandarizados para la interpretación del MIC dificulta la clasificación clara de las cepas como sensibles o resistentes, especialmente para antimicrobianos comúnmente usados en la industria avícola. En este sentido, es fundamental avanzar hacia la implementación de métodos estandarizados tanto de MIC como moleculares de RAM para micoplasmas aviares, que permitan la comparación de resultados entre laboratorios y faciliten la toma de decisiones clínicas más precisas.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

Los resultados de este estudio corresponden a la primera caracterización molecular por MLST de *Mycoplasma gallisepticum* y *M. synoviae* y la primera aproximación a los genotipos de RAM en estas especies en Colombia. El análisis basado en MLST y los árboles filogenéticos permitieron identificar diversidad genética entre las cepas de Mg y Ms a partir de pools de muestras de granjas avícolas en Colombia.

En esta investigación se identificó la circulación de cepas de campo de Mg y cepa ST5 vacunal. Además, estas ST ND tienen cambios en aminoácidos en QRDR, lo que implica que además de ser cepas de campo, están circulando con genotipos de resistencia.

Para Ms, los perfiles alélicos fueron altamente variables, con un predominio de secuencias no registradas en la base de datos PubMLST, lo que indica una posible diversidad aún no documentada pero que debe ser un llamado a seguir investigando y caracterizando este patógeno en el país. Lo cual podría explicar las fallas vacunales que se están presentando en el país y buscar alternativas para inmunización. Esta información indica un panorama general de los micoplasmas aviares en las regiones de donde provienen las muestras analizadas, lo cual es fundamental para establecer relaciones evolutivas entre cepas y posibles fuentes de transmisión. En ambos casos es importante poder relacionar la información con casos clínicos y con pruebas de sensibilidad a antibióticos para corroborar los hallazgos.

En cuanto a la resistencia a fluoroquinolonas, se identificaron mutaciones puntuales en genes blanco como *gyrA* y *parC*, las cuales están asociadas con RAM en las especies

estudiadas. Aunque se requieren de estudios fenotípicos en este aspecto y realizar pruebas estandarizadas de MIC para micoplasma, el hecho de encontrar este hallazgo permite inferir que posiblemente existen genotipos que presentan RAM. Por lo tanto, es posible que el tratamiento contra esta enfermedad a nivel de granja sea difícil a partir del uso de fluoroquinolonas. En ese orden de ideas, también hay que realizar estudios con antibióticos como las tetraciclinas, los macrólidos y las pleuromutilinas con el fin de realizar también un tamizaje de frente al escenario de RAM mucho más completo para la Micoplasmosis aviar en el país.

4.2 Recomendaciones

A partir de estos hallazgos, se recomienda fortalecer los programas de vigilancia epidemiológica molecular que integren el uso de MLST como herramienta clave para monitorear la circulación de cepas vacunales y de campo, así como la identificación de nuevos genotipos de micoplasmas en las poblaciones avícolas. Esta vigilancia debería contemplar la recolección sistemática de muestras en distintas regiones del país y en diferentes tipos de producción avícola, con el fin de obtener una visión más amplia de la dinámica poblacional de *M. gallisepticum* y *M. synoviae*. De igual manera, se recomienda contribuir activamente al fortalecimiento de las bases de datos internacionales como PubMLST, mediante la inclusión de nuevos perfiles alélicos y secuencias provenientes de Colombia y América Latina.

La alta proporción de secuencias no clasificadas dentro del estudio revela una brecha importante en la representación regional, lo que limita las posibilidades de comparación y rastreo de cepas. Ampliar la base de datos contribuirá no solo al conocimiento científico global, sino también al diseño de estrategias de control específicas adaptadas a la realidad epidemiológica local. De igual manera, la información obtenida en este estudio es un aporte en la caracterización inicial de genotipos de micoplasmas circulantes en el país que servirá como base para estudios futuros para que se pueda establecer la existencia o no de la relación entre diferencias a nivel de genotipos y signos clínicos asociados a Micoplasmosis aviar.

En cuanto a la detección de RAM, es fundamental implementar metodologías estandarizadas para la determinación de MIC, que permitan validar los hallazgos

moleculares mediante pruebas fenotípicas. Las mutaciones identificadas en *gyrA* y *parC* sugieren resistencia a fluoroquinolonas, pero la confirmación mediante pruebas *in vitro* bajo criterios definidos de punto de corte es necesaria para evaluar la eficacia clínica de los tratamientos. Además, se debe incentivar la investigación de posibles mecanismos de resistencia no asociados a mutaciones puntuales, ya que en algunos casos la ausencia de cambios en genes blanco no descarta la presencia de resistencia. Considerando la identificación de múltiples mutaciones asociadas con RAM en cepas no vacunales, es prioritario fortalecer las políticas de uso racional y prudente de antimicrobianos en la avicultura. Esto incluye la capacitación continua a Médicos Veterinarios y productores, la adopción de protocolos de prescripción basados en diagnóstico y la promoción del uso de alternativas como vacunas efectivas y mejoras en las condiciones de bioseguridad. El uso indiscriminado de fluoroquinolonas ha sido un factor clave en la selección de cepas resistentes, por lo que se recomienda establecer regulaciones claras para su uso terapéutico.

5. Bibliográfia

- Abdelrahman, A. A., S Shany, S. A., A Dardeer, M. A., Hassan, K. E., Ali, A., & El-Kady, M. F. (2021). Avian *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*: Advances in diagnosis and control. *German Journal of Veterinary Research*, 1(2), 46–55. <https://doi.org/https://doi.org/10.51585/gjvr.2021.2.0019>
- Adékambi, T., Drancourt, M., & Raoult, D. (2009). The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. In *Trends in Microbiology* (Vol. 17, Issue 1, pp. 37–45). <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.09.008>
- Armour, N. K., Laibinis, V. A., Collett, S. R., & Ferguson-Noel, N. (2013). The development and application of a *Mycoplasma gallisepticum* sequence database. *Avian Pathology*, 42(5), 408–415. <https://doi.org/10.1080/03079457.2013.819486>
- Bahl, M. (2009). *Horizontal Gene Transfer* (M. B. Gogarten, J. P. Gogarten, & L. C. Olendzenski, Eds.; Vol. 532). Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-853-9>
- Bekő, K., Kreizinger, Z., Kovács, Á. B., Sulyok, K. M., Marton, S., Bányai, K., Catania, S., Feberwee, A., Wiegel, J., Dijkman, R., ter Veen, C., Lysnyansky, I., & Gyuranecz, M. (2020). Mutations potentially associated with decreased susceptibility to fluoroquinolones, macrolides and lincomycin in *Mycoplasma synoviae*. *Veterinary Microbiology*, 248. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108818>
- Bekő, K., Kreizinger, Z., Sulyok, K. M., Kovács, Á. B., Gróznér, D., Catania, S., Bradbury, J., Lysnyansky, I., Olaogun, O. M., Czanik, B., Ellakany, H., & Gyuranecz, M. (2019). Genotyping *Mycoplasma gallisepticum* by multilocus sequence typing. *Veterinary Microbiology*, 231, 191–196. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.03.016>
- Benčina, D., Drobnič-Valič, M., Horvat, S., Narat, M., Kleven, S. H., & Dovč, P. (2001a). Molecular basis of the length variation in the N-terminal part of *Mycoplasma synoviae* hemagglutinin. *FEMS Microbiology Letters*, 203(1), 115–123. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10829.x>

- Benčina, D., Drobnič-Valič, M., Horvat, S., Narat, M., Kleven, S. H., & Dovč, P. (2001b). Molecular basis of the length variation in the N-terminal part of *Mycoplasma synoviae* hemagglutinin. *FEMS Microbiology Letters*, 203(1), 115–123. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10829.x>
- Benčina, D. (2002). Haemagglutinins of pathogenic avian mycoplasmas. In *Avian Pathology* (Vol. 31, Issue 6, pp. 535–547). <https://doi.org/10.1080/0307945021000024526>
- Berčič, R. L., Slavec, B., Lavrič, M., Narat, M., Bidovec, A., Dovč, P., & Benčina, D. (2008). Identification of major immunogenic proteins of *Mycoplasma synoviae* isolates. *Veterinary Microbiology*, 127(1–2), 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.07.020>
- Bhatt, S., & Chatterjee, S. (2022). Fluoroquinolone antibiotics: Occurrence, mode of action, resistance, environmental detection, and remediation – A comprehensive review. *Environmental Pollution*, 315. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120440>
- Bicout, D., Bøtner, A., Butterworth, A., Calistri, P., Depner, K., Edwards, S., Garin-Bastuji, B., Good, M., Gortazar Schmidt, C., Michel, V., Angel Miranda, M., More, S., Saxmose Nielsen, S., Raj, M., Sihvonen, L., Spooler, H., Arend Stegeman, J., Thulke, H.-H., Velarde, A., ... Winckler, C. (2017). 2016/429): avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. meleagridis*). *Animal Health Law*, 15(8), 4953. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4953>
- Bottinelli, M., Gastaldelli, M., Picchi, M., Dall'Ora, A., Cristovao Borges, L., Ramírez, A. S., Matucci, A., & Catania, S. (2022). The Monitoring of *Mycoplasma gallisepticum* Minimum Inhibitory Concentrations during the Last Decade (2010–2020) Seems to Reveal a Comeback of Susceptibility to Macrolides, Tiamulin, and Lincomycin. *Antibiotics*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081021>
- Bradbury, J. M. (2005). Poultry mycoplasmas: Sophisticated pathogens in simple guise. *British Poultry Science*, 46(2), 125–136. <https://doi.org/10.1080/00071660500066282>
- Burgos, R., & Totten, P. A. (2014). Characterization of the operon encoding the holliday junction helicase RuvAB from *Mycoplasma genitalium* and its role in *mgpB* and *mgpC* gene variation. *Journal of Bacteriology*, 196(8), 1608–1618. <https://doi.org/10.1128/JB.01385-13>
- Bustos, F., Mossos Nestor, de Navas, Y., & Peña, N. (1988). Tres condiciones contribuyentes al complejo respiratorio aviar en pollos de la región del Sumapaz (Colombia). *Revista ICA*, 23. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/19969>

- Carrion, Luis José, Baldrich Ferrer, Rita, Ramírez Nieto, Gloria Consuelo, & Vera Alfonso, Víctor Julio. (2012). Diferenciación de cepas de *Mycoplasma gallisepticum* a partir de RFLP. *Revista de Medicina Veterinaria*, (24), 113-121. Retrieved August 15, 2025, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-93542012000200011&lng=en&tlng=es.
- Choi, B., & Zocchi, G. (2007). Guanylate kinase, induced fit, and the allosteric spring probe. *Biophysical Journal*, 92(5), 1651–1658. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.092866>
- Citti, C., Nouvel, L. X., & Baranowski, E. (2010). Phase and antigenic variation in mycoplasmas. In *Future Microbiology* (Vol. 5, Issue 7, pp. 1073–1085). Future Medicine Ltd. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.71>
- COBB, S. P. (2011). The spread of pathogens through trade in poultry hatching eggs: overview and recent developments. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 30(1), 165–175. <https://doi.org/10.20506/rst.30.1.2025>
- Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*, 16(22), 10881–10890. <https://doi.org/10.1093/nar/16.22.10881>
- Dijkman, R., Feberwee, A., & Landman, W. J. M. (2017). Development, validation and field evaluation of a quantitative real-time PCR able to differentiate between field *Mycoplasma synoviae* and the MS-H-live vaccine strain. *Avian Pathology*, 46(4), 403–415. <https://doi.org/10.1080/03079457.2017.1296105>
- Drlica, K., & Malik, M. (2003). Fluoroquinolones: Action and Resistance. In *Current Topics in Medicinal Chemistry* (Vol. 3). doi: 10.2174/1568026033452537.
- Dybvig, K., Hollingshead, S. K., Heath, D. G., Clewell, D. B., Sun, F., & Woodard, A. (1992). Degenerate Oligonucleotide Primers for Enzymatic Amplification of *recA* Sequences from Gram-Positive Bacteria and Mycoplasmas. In *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*.
- El-Gazzar, M., Ghanem, M., McDonald, K., Ferguson-Noel, N., Raviv, Z., & Slemons, R. D. (2017). Development of Multilocus Sequence Typing (MLST) for *Mycoplasma synoviae*. *Avian Diseases*, 61(1), 25–32. <https://doi.org/10.1637/11417-040516-Reg>
- El-Gazzar, M. M., Wetzel, A. N., & Raviv, Z. (2012). The genotyping potential of the *Mycoplasma synoviae* *vlhA* gene. *Avian Diseases*, 56(4), 711–719. <https://doi.org/10.1637/10200-041212-Reg.1>
- Feberwee, A., De Wit, J. J., & Landman, W. J. M. (2009). Induction of eggshell apex abnormalities by *Mycoplasma synoviae*: Field and experimental studies. *Avian Pathology*, 38(1), 77–85. <https://doi.org/10.1080/03079450802662772>

- Feberwee, A., de Wit, S., & Dijkman, R. (2022). Clinical expression, epidemiology, and monitoring of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*: an update. In *Avian Pathology* (Vol. 51, Issue 1, pp. 2–18). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/03079457.2021.1944605>
- Feberwee, A., Dijkman, R., Klinkenberg, D., & Landman, W. J. M. (2017). Quantification of the horizontal transmission of *Mycoplasma synoviae* in non-vaccinated and MS-H-vaccinated layers. *Avian Pathology*, 46(4), 346–358. <https://doi.org/10.1080/03079457.2017.1282602>
- Ferguson-Noel, N. (2013). Mycoplasmosis. In D. Swayne (Ed.), *Diseases of poultry* (Vol. 13, pp. 875–876). Wiley-Blackwell.
- Ferguson-Noel, N., Armour, N. K., Noormohammadi, A. H., El-Gazzar, M., & Bradbury, J. M. (2020). Mycoplasmosis. In *Diseases of Poultry* (pp. 907–965). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119371199.ch21>
- Fisunov, G. Y., Alexeev, D. G., Bazaleev, N. A., Ladygina, V. G., Galyamina, M. A., Kondratov, I. G., Zhukova, N. A., Serebryakova, M. V., Demina, I. A., & Govorun, V. M. (2011). Core proteome of the minimal cell: Comparative proteomics of three mollicute species. *PLoS ONE*, 6(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021964>
- Galluzzo, P., Migliore, S., Galuppo, L., Condorelli, L., Hussein, H. A., Licitra, F., Coltraro, M., Sallemi, S., Antoci, F., Cascone, G., Puleio, R., & Loria, G. R. (2022). First Molecular Survey to Detect *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in Poultry Farms in a Strategic Production District of Sicily (South-Italy). *Animals*, 12(8). <https://doi.org/10.3390/ani12080962>
- García, M., Ikuta, N., Levisohn, S., & Kleven, S. H. (2005). Evaluation and comparison of various PCR methods for detection of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. *Avian Diseases*, 49(1), 125–132. <https://doi.org/10.1637/7261-0812204R1>
- Gautier-Bouchardon, A. V., Reinhardt, A. K., Kobisch, M., & Kempf, I. (2002). In vitro development of resistance to enrofloxacin, erythromycin, tylosin, tiamulin and oxytetracycline in *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma iowae* and *Mycoplasma synoviae*. *Veterinary Microbiology*, 88(1), 47–58. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00087-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00087-1)
- Gautier-Bouchardon, A. V. (2018). Antimicrobial Resistance in *Mycoplasma* spp. *Microbiology Spectrum*, 6(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0030-2018>
- Gerchman, I., Levisohn, S., Mikula, I., Manso-Silvan, L., & Lysnyansky, I. (2011). Characterization of in vivo-acquired resistance to macrolides of *Mycoplasma*

- gallisepticum strains isolated from poultry. *Veterinary Research*, 42(1), 90. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-90>
- Gharaibeh, S., Laibinis, V., Wooten, R., Stabler, L., & Ferguson-Noel, N. (2011). Molecular characterization of *Mycoplasma gallisepticum* isolates from Jordan. *Avian Diseases*, 55(2), 212–216. <https://doi.org/10.1637/9526-091510-Reg.1>
- Giles, C. J., & Yavari, C. A. (1994). In vitro evaluation of various antimicrobials against mycoplasma gallisepticum and mycoplasma synoviae by the micro-broth method, and comparison with a commercially-prepared test system. *Avian Pathology*, 23(1), 105–115. <https://doi.org/10.1080/03079459408418978>
- Glew, M. D., Baseggio, N., Markham, P. F., Browning, G. F., & Walker, I. D. (1998). Expression of the pMGA Genes of *Mycoplasma gallisepticum* Is Controlled by Variation in the GAA Trinucleotide Repeat Lengths within the 5 Noncoding Regions. In *INFECTION AND IMMUNITY* (Vol. 66, Issue 12).
- Gorbachev, A. Y., Fisunov, G. Y., Izraelson, M., Evsyutina, D. V., Mazin, P. V., Alexeev, D. G., Pobeguts, O. V., Gorshkova, T. N., Kovalchuk, S. I., Kamashev, D. E., & Govorun, V. M. (2013). DNA repair in *Mycoplasma gallisepticum*. *BMC Genomics*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-726>
- Hooper, D. C. (2001). Mechanisms of Action of Antimicrobials: Focus on Fluoroquinolones INHIBITION OF CELL WALL SYNTHESIS. In *Mechanisms of Fluoroquinolone Action • CID* (Vol. 32, Issue 1). https://academic.oup.com/cid/article/32/Supplement_1/S9/298541
- Hooper, D. C., & Jacoby, G. A. (2016). Topoisomerase inhibitors: Fluoroquinolone mechanisms of action and resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025320>
- Hummels, K. R., & Kearns, D. B. (2021). Translation elongation factor P (EF-P). In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 44, Issue 2, pp. 208–218). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUAA003>
- Ishfaq, M., Hu, W., Khan, M. Z., Ahmad, I., Guo, W., & Li, J. (2020). Current status of vaccine research, development, and challenges of vaccines for *Mycoplasma gallisepticum*. In *Poultry Science* (Vol. 99, Issue 9, pp. 4195–4202). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.06.014>
- Jolley, K. A., Bray, J. E., & Maiden, M. C. J. (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Research*, 3, 124. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
- Kandavelmani, A., & Piramanayagam, S. (2019). Comparative genomics of *Mycoplasma*: Insights on genome reduction and identification of potential

antibacterial targets. *Biomedical and Biotechnology Research Journal (BBRJ)*, 3(1), 9. https://doi.org/10.4103/bbrj.bbrj_142_18

Khan, A. (2018). Diagnosis of Avian Mycoplasmas: A Comparison between PCR and Culture Technique. In *Archives of Razi Institute* (Vol. 73, Issue 3).

Khiari, A. B., & Mardassi, B. B. A. (2012). Characterization of the antigenic and functional domains of a *Mycoplasma synoviae* variant vlhA gene. *Veterinary Microbiology*, 156(3–4), 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.11.016>

Kleven, S. H. (1998). Mycoplasmas in the etiology of multifactorial respiratory disease. *Poultry Science*, 77(8), 1146–1149. <https://doi.org/10.1093/ps/77.8.1146>

Kleven, S. H. (2008). Control of avian mycoplasma infections in commercial poultry. In *Avian Diseases* (Vol. 52, Issue 3, pp. 367–374). <https://doi.org/10.1637/8323-041808-Review.1>

Kreizinger, Z., Sulyok, K. M., Bekő, K., Kovács, Á. B., Gróznér, D., Felde, O., Marton, S., Bányai, K., Catania, S., Benčina, D., & Gyuranecz, M. (2018). Genotyping *Mycoplasma synoviae*: Development of a multi-locus variable number of tandem-repeats analysis and comparison with current molecular typing methods. *Veterinary Microbiology*, 226, 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.10.012>

Kristiansson, E., Fick, J., Janzon, A., Grabic, R., Rutgersson, C., Weijdegård, B., Söderström, H., & Joakim Larsson, D. G. (2011). Pyrosequencing of antibiotic-contaminated river sediments reveals high levels of resistance and gene transfer elements. *PLoS ONE*, 6(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017038>

Kursa, O., Tomczyk, G., & Sawicka, A. (2019). Prevalence and phylogenetic analysis of *Mycoplasma synoviae* strains isolated from Polish chicken layer flocks. *Journal of Veterinary Research (Poland)*, 63(1), 41–49. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2019-0010>

Levisohn, S., & Kleven, S. H. (2000). Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*). In *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz* (Vol. 19, Issue 2), 425–442.

Limsatanun, A., Pakpinyo, S., Limpavithayakul, K., & Prasertsee, T. (2022a). Targeted sequencing analysis of *Mycoplasma gallisepticum* isolates in chicken layer and breeder flocks in Thailand. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14066-4>

Limsatanun, A., Pakpinyo, S., Limpavithayakul, K., & Prasertsee, T. (2022b). Targeted sequencing analysis of *Mycoplasma gallisepticum* isolates in chicken

- layer and breeder flocks in Thailand. *Scientific Reports*, 12(1).
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-14066-4>
- Liu, J., Cheng, Z., Zhou, D., Zhang, L., Yan, Z., Wang, Z., Yang, D., Liu, Y., & Chai, T. (2011). Synthesis, cloning, and expression of *Mycoplasma suis* inorganic pyrophosphatase gene using PCR-based accurate synthesis and overlap-extension PCR, and its immunogenicity analysis. *Research in Veterinary Science*, 91(3). <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.02.009>
- Lysnyansky, I., Gerchman, I., Levisohn, S., Mikula, I., Feberwee, A., Ferguson, N. M., Noormohammadi, A. H., Spergser, J., & Windsor, H. M. (2012). Discrepancy between minimal inhibitory concentration to enrofloxacin and mutations present in the quinolone-resistance determining regions of *Mycoplasma gallisepticum* field strains. *Veterinary Microbiology*, 160(1–2), 222–226.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.05.002>
- Lysnyansky, I., Gerchman, I., Mikula, I., Gobbo, F., Catania, S., & Levisohn, S. (2013). Molecular characterization of acquired enrofloxacin resistance in *Mycoplasma synoviae* field isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(7), 3072–3077. <https://doi.org/10.1128/AAC.00203-13>
- Lysnyansky, I., Gerchman, I., Perk, S., & Levisohn, S. (2008). Molecular characterization and typing of enrofloxacin-resistant clinical isolates of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Diseases*, 52(4), 685–689.
<https://doi.org/10.1637/8386-063008-RESNOTE.1>
- Markham, J. F., Morrow, C. J., & Whithear, K. G. (1998). Efficacy of a Temperature-Sensitive *Mycoplasma synoviae* Live Vaccine. *Avian Diseases*, 42(4), 671.
<https://doi.org/10.2307/1592701>
- Matucci, A., Stefani, E., Gastaldelli, M., Rossi, I., De Grandi, G., Gyuranecz, M., & Catania, S. (2020). Molecular differentiation of *mycoplasma gallisepticum* outbreaks: A last decade study on italian farms using gts and mlst. *Vaccines*, 8(4), 1–15. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040665>
- May, M., & Brown, D. R. (2008). Genetic variation in sialidase and linkage to N-acetylneuraminase catabolism in *Mycoplasma synoviae*. *Microbial Pathogenesis*, 45(1), 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2008.02.002>
- Michiels, T., Welby, S., Vanrobaeys, M., Quinet, C., Rouffaer, L., Lens, L., Martel, A., & Butaye, P. (2016). Prevalence of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in commercial poultry, racing pigeons and wild birds in Belgium. *Avian Pathology*, 45(2), 244–252. <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1145354>
- Morrow CJ, Kreizinger Z, Achari RR, Beko K, Yvon C, Gyuranecz M, Antimicrobial susceptibility of pathogenic mycoplasmas in chickens in Asia, *Veterinary Microbiology* (2020), doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108840>

- Morrow, C. J. (2024). Antimicrobial resistance (AMR): an important one health issue for layer and meat poultry industries worldwide. In *Poultry Science* (Vol. 103, Issue 7). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.103690>
- Mugunthan, S. P., Kannan, G., Chandra, H. M., & Paital, B. (2023a). Infection, Transmission, Pathogenesis and Vaccine Development against *Mycoplasma gallisepticum*. In *Vaccines* (Vol. 11, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/vaccines11020469>
- Mugunthan, S. P., Kannan, G., Chandra, H. M., & Paital, B. (2023b). Infection, Transmission, Pathogenesis and Vaccine Development against *Mycoplasma gallisepticum*. In *Vaccines* (Vol. 11, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/vaccines11020469>
- Muhammad, Javid Hussain, Syed Khurram Fareed, T. A. Khan, S. A. Khan, & Aqeel Ahmad. (2018). Diagnosis of Avian Mycoplasmas: A Comparison between PCR and Culture Technique. In *Archives of Razi Institute* (Vol. 73, Issue 3). <https://doi.org/10.22092/ari.2017.108217.1085>
- Nakanishi-Matsui, M., Sekiya, M., & Futai, M. (2016). ATP synthase from *Escherichia coli*: Mechanism of rotational catalysis, and inhibition with the ϵ subunit and phytopolyphenols. In *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* (Vol. 1857, Issue 2, pp. 129–140). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.11.005>
- Nascimento, E., Pereira, V., Nascimento, M., & Barreto, M. (2005). Avian mycoplasmosis update. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1590/S1516-635X2005000100001>
- Nhung, N. T., Chansiripornchai, N., & Carrique-Mas, J. J. (2017). Antimicrobial resistance in bacterial poultry pathogens: A review. In *Frontiers in Veterinary Science* (Vol. 4, Issue AUG). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00126>
- O'brien, S. J., Simonson, J. M., Grabowski, M. W., & Barile, M. F. (1981). Analysis of Multiple Isoenzyme Expression Among Twenty-Two Species of *Mycoplasma* and *Acholeplasma*. In *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* (Vol. 146, Issue 1).
- Okonechnikov, K., Golosova, O., & Fursov, M. (2012). Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 28(8), 1166–1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
- Omotainse, O. S., Wawegama, N. K., Kulappu Arachchige, S. N., Mauricio, M. J., Vaz, P. K., Woodward, A. P., Kordafshari, S., Bogeski, M., Stevenson, M., Noormohammadi, A. H., & Stent, A. W. (2022). Tracheal cellular immune response in chickens inoculated with *Mycoplasma synoviae* vaccine, MS-H or its parent strain 86079/7NS. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 251. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2022.110472>

- OMSA. (2021). *OIE. Terrestrial Manual 2021. Chapter 3-03-05-avian-myco.*
<https://www.woah.org/es/enfermedad/micoplasmosis-aviar-mycoplasma-gallisepticum/>
- OMSA. (2022). *Estrategia sobre la resistencia a los agentes antimicrobianos y su uso prudente Preservando la eficacia de los antimicrobianos.*
<https://www.woah.org/app/uploads/2021/12/es-amr-strategy-2022-final-pages-1.pdf>
- Otero, J. L., Mestorino, N., & Errecalde, J. O. (2001a). ENROFLOXACINA: UNA FLUORQUINOLONA DE USO EXCLUSIVO EN VETERINARIA PARTE I: QUÍMICA, MECANISMO DE ACCIÓN, ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y RESISTENCIA BACTERIANA ENROFLOXACIN: A FLUORQUINOLONE OF EXCLUSIVE USE IN VETERINARY. PART I: CHEMICAL CHARACTERISTICS, MECHANISM OF ACTION, ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND BACTERIAL RESISTANCE. *ANALECTA VETERINARIA*, 21, 31–41.
- Otero, J. L., Mestorino, N., & Errecalde, J. O. (2001b). ENROFLOXACINA UNA FLUORQUINOLONA DE USO EXCLUSIVO EN VETERINARIA PARTE II: FARMACOCINÉTICA Y TOXICIDAD ENROFLOXACIN: A FLUORQUINOLONE OF EXCLUSIVE USE IN VETERINARY. PART II: PHARMACOKINETIC AND TOXICITY. *42 ANALECTA VETERINARIA*, 21, 42–49.
- Papazisi, L., Gorton, T. S., Kutish, G., Markham, P. F., Browning, G. F., Nguyen, D. K., Swartzell, S., Madan, A., Mahairas, G., & Geary, S. J. (2003). The complete genome sequence of the avian pathogen *Mycoplasma gallisepticum* strain Rlow. *Microbiology*, 149(9), 2307–2316. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26427-0>
- Rasmussen, O. F., Shirvan, M. H., Margalit, H., Christiansen, C., & Rottemt, S. (1992). Nucleotide sequence, organization and characterization of the atp genes and the encoded subunits of *Mycoplasma gallisepticum* ATPase. In *Biochem. J* (Vol. 285).
- Raviv, Z., Callison, S. A., Ferguson-Noel, N., & Kleven, S. H. (2008). Strain differentiating real-time PCR for *Mycoplasma gallisepticum* live vaccine evaluation studies. *Veterinary Microbiology*, 129(1–2), 179–187.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.11.017>
- Razin, S. (1992). Peculiar properties of mycoplasmas: The smallest self-replicating prokaryotes. In *FEMS Microbiology Letters* (Vol. 100).
<https://academic.oup.com/femsle/article/100/1-3/423/568053>
- Razin, S., Yogev, D., & Naot, Y. (1998). Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. In *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS* (Vol. 62, Issue 4).

- Redgrave, L. S., Sutton, S. B., Webber, M. A., & Piddock, L. J. V. (2014). Fluoroquinolone resistance: Mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. In *Trends in Microbiology* (Vol. 22, Issue 8, pp. 438–445). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.007>
- Reinhardt, A. K., Kempf, I., Kobisch, M., & Gautier-Bouchardon, A. V. (2002). Fluoroquinolone resistance in *Mycoplasma gallisepticum*: DNA gyrase as primary target of enrofloxacin and impact of mutations in topoisomerases on resistance level. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(4), 589–592. <https://doi.org/10.1093/jac/dkf158>
- Roberts, D. H., & McDaniel, J. W. (1967). Mechanism of egg transmission of *Mycoplasma gallisepticum*. *Journal of Comparative Pathology*, 77(4), 439–442. [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(67\)90030-8](https://doi.org/10.1016/0021-9975(67)90030-8)
- Roth, N., Käsbohrer, A., Mayrhofer, S., Zitz, U., Hofacre, C., & Domig, K. J. (2019). The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview. In *Poultry Science* (Vol. 98, Issue 4, pp. 1791–1804). Oxford University Press. <https://doi.org/10.3382/ps/pey539>
- Rottem, S. (2003). *Interaction of Mycoplasmas With Host Cells*. <https://doi.org/10.1152/phys>
- Salih, S. M., Jafar, N. A., & Noomi, B. S. (2020). *Prevalence of mycoplasma infection in poultry (gallus gallus domesticus) and evaluation of some diagnostic techniques*. www.japer.in
- SCHULZ, G. E., SCHILTZ, E., TOMASSELLI, A. G., FRANK, R., BRUNE, M., WITTINGHOFER, A., & SCHIRMER, R. H. (1986). Structural relationships in the adenylate kinase family. *European Journal of Biochemistry*, 161(1), 127–132. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1986.tb10132.x>
- Singh, P., Patil, K. N., Khanduja, J. S., Kumar, P. S., Williams, A., Rossi, F., Rizzi, M., Davis, E. O., & Muniyappa, K. (2010). Mycobacterium tuberculosis UvrD1 and UvrA proteins suppress DNA strand exchange promoted by cognate and noncognate RecA proteins. *Biochemistry*, 49(23), 4872–4883. <https://doi.org/10.1021/bi902021d>
- Spratt, B. G. (1999). Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the Internet. *Current Opinion in Microbiology*, 2(3), 312–316. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)80054-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)80054-X)
- Stipkovits, L., & Kempf, I. (1996). Mycoplasmoses in poultry. In *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz* (Vol. 15, Issue 4).
- Technelysium Pty Ltd. (2019). *Chromas* (2.6.6).

- ter Veen, C., Dijkman, R., de Wit, J. J., Gyuranecz, M., & Feberwee, A. (2021). Decrease of *Mycoplasma gallisepticum* seroprevalence and introduction of new genotypes in Dutch commercial poultry during the years 2001–2018. *Avian Pathology*, *50*(1), 52–60. <https://doi.org/10.1080/03079457.2020.1832958>
- Trinh, V., Langelier, M.-F., Archambault, J., & Coulombe, B. (2006). Structural Perspective on Mutations Affecting the Function of Multisubunit RNA Polymerases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *70*(1), 12–36. <https://doi.org/10.1128/mubr.70.1.12-36.2006>
- Tsaneva, I. R., Muller, B., & West, S. C. (1993). RuvA and RuvB proteins of *Escherichia coli* exhibit DNA helicase activity in vitro (recombination/DNA repair/Holliday junctions/branch migration/strand exchange). In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (Vol. 90).
- Vasconcelos, A. T. R., Ferreira, H. B., Bizarro, C. V., Bonatto, S. L., Carvalho, M. O., Pinto, P. M., Almeida, D. F., Almeida, L. G. P., Almeida, R., Alves-Filho, L., Assunção, E. N., Azevedo, V. A. C., Bogo, M. R., Brigido, M. M., Brocchi, M., Burity, H. A., Camargo, A. A., Camargo, S. S., Carepo, M. S., ... Zaha, A. (2005). Swine and poultry pathogens: The complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. *Journal of Bacteriology*, *187*(16), 5568–5577. <https://doi.org/10.1128/JB.187.16.5568-5577.2005>
- Ventura, C. E., Gloria Ramírez, M. V. ;, & Víctor Vera, ; (2012). DETECCIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE *Mycoplasma gallisepticum* Y *Mycoplasma synoviae* MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR A PARTIR DE HISOPOS TRAQUEALES DE AVES CON SÍNTOMAS RESPIRATORIOS Detection and Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* by PCR from Tracheal Swabs from Birds with Respiratory Symptoms. In *Acta biol. Colomb* (Vol. 17, Issue 3).
- Wetzel, A. N., Lefevre, K. M., & Raviv, Z. (2010). Revised *Mycoplasma synoviae* *vlhA* PCRs. *Avian Diseases*, *54*(4), 1292–1297. <https://doi.org/10.1637/9349-033010-ResNote.1>
- Wren, B. W. (2000). *MICROBIAL GENOME ANALYSIS: INSIGHTS INTO VIRULENCE, HOST ADAPTATION AND EVOLUTION*. www.nature.com/reviews/genetics
- Yadav, J. P., Tomar, P., Singh, Y., & Khurana, S. K. (2022). Insights on *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* infection in poultry: a systematic review. In *Animal Biotechnology* (Vol. 33, Issue 7, pp. 1711–1720). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/10495398.2021.1908316>
- Zhang, N., Wu, Y., Huang, Z., Zhang, C., Zhang, L., Cai, Q., Shen, X., Jiang, H., & Ding, H. (2018). Relationship between danofloxacin PK/PD parameters and

emergence and mechanism of resistance of *Mycoplasma gallisepticum* in In Vitro model. *PLoS ONE*, 13(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202070>

Zhu, L., Shahid, M. A., Markham, J., Browning, G. F., Noormohammadi, A. H., & Marena, M. S. (2018). Genome analysis of *Mycoplasma synoviae* strain MS-H, the most common *M. synoviae* strain with a worldwide distribution. *BMC Genomics*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4501-8>

6. Anexos

A. Comité de bioética



Bogotá D.C, noviembre 15 de 2023

[CB-FMVZ-UN-037-2023]

Doctoras
GLORIA CONSUELO RAMÍREZ NIETO
ARLEN PATRICIA GÓMEZ RAMÍREZ
Investigadoras principales

Respetadas doctoras:

Amablemente les comunico que el Comité de Bioética en sesión ordinaria, Acta 10 de 2023, luego de la revisión de la documentación al siguiente proyecto, acordó emitir el respectivo concepto, así:

Proyecto	“Genotipificación y mutaciones asociadas a resistencia antimicrobiana en cepas de Mycoplasma gallisepticum y M. synoviae en aves comerciales de Colombia”
Responsables del proyecto	Investigador(a) Principal: Gloria Consuelo Ramírez Nieto / Arlen Patricia Gómez Ramírez Estudiante/Programa: Sara Judith Forero Marín / Maestría en Salud Animal
Concepto	AVALADO

Es importante tener en cuenta que **este concepto sólo aplica para los procedimientos en las condiciones y con las características indicadas en el formato final y documentos presentados**. El investigador deberá informar sobre cualquier cambio que se proponga incluir y que esté relacionado con la ubicación, el cuidado y bienestar de los animales, estas modificaciones no podrán ejecutarse sin el aval previo del Comité; así mismo, se debe dar aviso sobre cualquier situación imprevista que se considere implique algún riesgo para los animales o la comunidad o el medio en el cual se lleva a cabo el estudio.

Cordialmente,

LUCÍA BOTERO ESPINOSA
Coordinadora Comité de Bioética

B. Proyecto ganador del concurso Fondo de Apoyo a la Investigación: Dr. Pedro Villegas Narváez de AMEVEA 2023



C. Participación como ponente en ENICIP 2023



Certifica que:

SARA JUDITH FORERO MARIN

Participó en el XVII Encuentro Nacional y X Internacional de Investigadores de las Ciencias Pecuarias en calidad de ponente.

Realizado en modalidad presencial los días 25, 26 y 27 de octubre de 2023


JENNY JOVANA CHAPARRO GUTIÉRREZ
Organizadora general ENICIP 2023


LUZ NATALIA FRANCO MONTOYA
Coordinadora académica ENICIP 2023



D. Participación en el Congreso XXI de FENAVI 2024



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA



PS 2

Genotipos de *Mycoplasma gallisepticum* detectados en granjas avícolas de Colombia

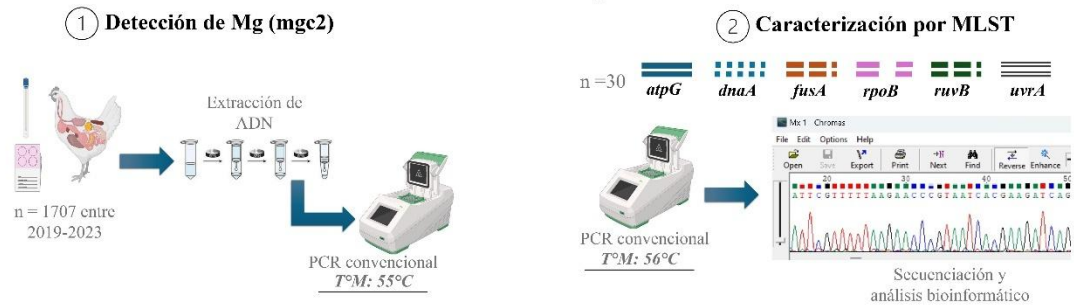
Forero Marín SJ¹; Gomez AP¹; Beltran-Leon M¹; Ramirez-Nieto GC¹

¹Grupo de Investigación en Microbiología y Epidemiología, Laboratorio de Biología Molecular y Virología - FMVZ, Universidad Nacional de Colombia
Correo electrónico: sjforerom@unal.edu.co
Temática: Patología - Sanidad

Introducción

La micoplasmosis aviar causada por *M. gallisepticum* afecta a unidades productivas de reproductoras y ponedoras comerciales y en menor medida a pollos de engorde ocasionando principalmente cuadros clínicos respiratorios. El diagnóstico y control de la enfermedad son difíciles debido a la variación antigénica que ocurre en las lipoproteínas de superficie que tiene el patógeno. A pesar de que la prevalencia de la enfermedad es alta y que existen estrategias de prevención y control, para que éstas sean efectivas, es necesario identificar y caracterizar molecularmente las cepas de *M. gallisepticum*. El **objetivo** de este estudio es identificar los genotipos de *Mycoplasma gallisepticum* circulantes en Colombia, como un aporte al diagnóstico de la enfermedad en el país.

Metodología



Resultados

Muestras positivas para Mg: 250/1707 (14,65%)

117 muestras con edades variables, provenientes de diferentes departamentos del país: 76,9% corresponde a reproductoras, el 18,8% a ponedoras y el 4,27% a pollo de engorde.

Detección gen mgc2

235 302 pb

Inclusión muestras para MLST:

- * Edad
- * Tipo de producción
- * Procedencia

Esquema MLST: 30 muestras
Secuenciación: 10 muestras

Perfiles alélicos

ID	atpG	dnaA	fusA	rpoB	ruvB	uvrA	ST
1	1	18	2	21	8	3	5
2	1	18	2	21	8	3	5
3	4	19	1	8	28	21	N/R

Discusión

Con la técnica Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST), en este estudio, se han logrado identificar tres tipos de secuencias (ST). De acuerdo con lo reportado en PubMLST: las muestras 1 y 2 corresponden a la ST 5 la cual está relacionada con la cepa vacunal F, empleada en las estrategias de prevención y control de la enfermedad en el país. La muestra 3 no tiene una coincidencia exacta con lo registrado en PubMLST, sugiriendo la posibilidad de ser un genotipo colombiano.

Conclusiones

- La genotipificación de muestras de Mg por medio de MLST permite diferenciar cepas vacunales de genotipos de campo. Así mismo, permite una mayor diferenciación entre detecciones de campo.
- Es importante relacionar estos resultados con genotipos de resistencia antimicrobiana con el fin de aportar al control de la enfermedad.

Bibliografía

1. Bekó, K., Kreizinger, Z., Sulyok, K. M., Kovács, Á. B., Grözner, D., Csanik, B., Bradbury, J., Lysymansky, I., Olsogin, O. M., Czaniik, B., Ellakany, H., & Gyuranecz, M. (2019). Genotyping *Mycoplasma gallisepticum* by multilocus sequence typing. *Veterinary Microbiology*, 231, 191–196. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.03.016>.
2. Ferguson-Noel, N. (2013). *Mycoplasmosis*. In D. Swayne (Ed.), *Diseases of poultry* (Vol. 13, pp. 875–876). Wiley-Blackwell.
3. Nascimento, E. R., Jr, N., Vía, P., Mgl, N., & Mi, B. (2005). *Brazilian Journal of Poultry Science Revista Brasileira de Ciência Avícola Avian Mycoplasmosis Update*. [https://www.scielo.br/j/bca/a1.8Gjy7wXmRR4T1JyqFqJ1?format=pdf⟨=en](https://www.scielo.br/j/bca/a1.8Gjy7wXmRR4T1JyqFqJ1?format=pdf&lang=en)
4. OMSA. (2021). *OIE Terrestrial Manual 2021, Chapter 3-03-05-avian-mycob*. <https://www.woah.org/es/enfermedades/micoplasmosis-aviar-mycoplasma-gallisepticum/>

E. Participación en PANVET 2024 en Montevideo, Uruguay



Genotipos de resistencia a fluoroquinolonas en *Mycoplasma gallisepticum* en aves comerciales de Colombia

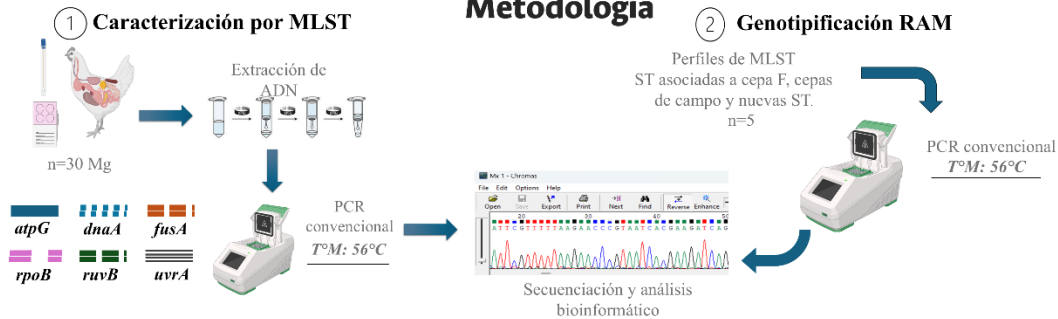
Forero Marín SJ¹; Gomez AP¹; Beltran-Leon M¹; Ramirez-Nieto GC¹

¹Grupo de Investigación en Microbiología y Epidemiología. Laboratorio de Biología Molecular y Virología - FMVZ. Universidad Nacional de Colombia
Correo electrónico: sjforerom@unal.edu.co
Temática: Patología - Sanidad

Introducción

Agentes bacterianos como *Mycoplasma gallisepticum* (Mg) afectan a las aves reproductoras y ponedoras comerciales y en menor medida a pollos de engorde presentando principalmente cuadros clínicos respiratorios y reproductivos. El diagnóstico y control de la enfermedad son difíciles debido a la variación antigénica en las lipoproteínas de superficie que tienen ambos patógenos y a las dificultades en el aislamiento bacteriano. Por lo tanto, se recurre al uso de antibióticos como profilaxis o de igual manera, para tratar la enfermedad sin un diagnóstico oportuno. La micoplasmosis aviar es prevalente y a pesar de que existen estrategias de prevención y control, para que éstas sean efectivas, es necesario identificar y caracterizar molecularmente las cepas y su asociación con resistencia a antibióticos presentes en Colombia. El objetivo de este trabajo es la identificación de los genotipos de Mg circulante en Colombia y su asociación con genes de resistencia a fluoroquinolonas.

Metodología



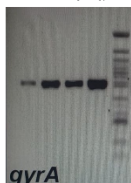
Resultados

Perfiles alélicos por MLST

ID	atpG	dnaA	fusA	rpoB	ruvB	uvrA	ST
1	1	18	2	21	8	3	5
2	1	18	2	21	8	3	5
3	4	19	1	8	28	21	147*
4	5	18	35	9	7	3	N/D
5	1	18	2	21	8	17	N/D

De acuerdo con la base de datos PubMLST, las ST obtenidas fueron 5 y 147, las cuales corresponden a la Cepa F y una nueva ST y dos perfiles que no se encuentran determinadas.

Detección gen *gyrA*



Identificación de mutaciones en QRDR

Consensus:	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
T S G L T + D K P Y R K S A Q I V G H V M G K Y H P H G D S A I Y E T	T S G L T	D K P Y R K S A Q I V G H V M G K Y H P H G D S A I Y E T	D K P Y R K S A Q I V G H V M G K Y H P H G D S A I Y E T	D K P Y R K S A Q I V G H V M G K Y H P H G D S A I Y E T	D K P Y R K S A Q I V G H V M G K Y H P H G D S A I Y E T	D K P Y R K S A Q I V G H V M G K Y H P H G D S A I Y E T	D K P Y R K S A Q I V G H V M G K Y H P H G D S A I Y E T	D K P Y R K S A Q I V G H V M G K Y H P H G D S A I Y E T	D K P Y R K S A Q I V G H V M G K Y H P H G D S A I Y E T	D K P Y R K S A Q I V G H V M G K Y H P H G D S A I Y E T	D K P Y R K S A Q I V G H V M G K Y H P H G D S A I Y E T	D K P Y R K S A Q I V G H V M G K Y H P H G D S A I Y E T	D K P Y R K S A Q I V G H V M G K Y H P H G D S A I Y E T

Mutaciones identificadas:
-His69- Tyr
-Ser93- Ile

Discusión

Con la técnica Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST), en este estudio, se han logrado identificar tres tipos de secuencias (ST). De acuerdo con lo reportado en PubMLST: las muestras 1 y 2 corresponden a la ST 5 la cual está relacionada con la cepa vacunal F, empleada en las estrategias de prevención y control de la enfermedad en el país, mientras que la ST 147 corresponde a un nuevo genotipo colombiano. Las muestras 4 y 5 pueden sugerir otros nuevos genotipos colombianos. Las mutaciones encontradas en *gyrA* se han relacionado con genotipos de resistencia a fluoroquinolonas en las QRDR; estas mutaciones no necesariamente hacen a las cepas resistentes pero su suponen un riesgo para la RAM.

Conclusiones

- La genotipificación de muestras de Mg por medio de MLST permite diferenciar cepas vacunales de genotipos de campo. Así mismo, permite una mayor diferenciación entre detecciones de campo.
- Es importante relacionar estos resultados de genotipos de resistencia antimicrobiana con pruebas fenotípicas con el fin de aportar al control de la enfermedad.

Bibliografía

- Bukó, K., Koczián, Z., Silyó, K. M., Kovács, Á. B., Grósz, D., Csánai, S., Bradbury, J., Fenyvesi, I., Ólasz, O. M., Czirái, B., Elbakour, H., & Gyuranecz, M. (2019). Genotyping *Mycoplasma gallisepticum* by multilocus sequence typing. *Veterinary Microbiology*, 231, 191–196. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.03.016>
- Ferguson-Najel, N. (2012). *Mycoplasmas*. In D. Swayne (ed.), *Diseases of poultry* (Vol. 12, pp. 875–876). Wiley-Blackwell.
- Nascimento, E. R., Et, N., Vile, P., Mag, N., & M, B. (2005). Brazilian Journal of Poultry Science. *Revisão Brasileira de Ciência Avícola Avian Mycoplasmosis*. [https://www.scielo.br/bjps/abstract/BJPS70xXmFR8FTT3gPrfQ?format=pdf⟨=en](https://www.scielo.br/bjps/abstract/BJPS70xXmFR8FTT3gPrfQ?format=pdf&lang=en)
- OMSA. (2021). OIE. *Terrestrial Manual 2021*. Chapter 3-03-05-avian-nyco. <https://www.woah.org/es/enfermedad/micoplasmosis-avian-nyco/micoplasma-gallisepticum/>
- Fenyvesi, I., Gerchman, T., Peib, S., & Tsvishin, S. (2006). Molecular characterization and typing of enrofloxacin-resistant clinical isolates of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Diseases*, 52(4), 685–689. <https://doi.org/10.1637/3386-063806-01JN0011.1>

PANVET 2024
"UNA SALUD: Una voz desde todas las áreas de la profesión" URUGUAY
XXVII 3, 4, 5 y 6 de diciembre
MONTEVIDEO, URUGUAY

Sara Judith Forero Marín ha participado en el XXVII Congreso, los días 3, 4, 5 y 6 de diciembre en Montevideo, Uruguay.

J. Piaggio
Dr. José Piaggio
Decano
Facultad de Veterinaria
UDELAR

R. Azoretto
Dr. Radolfo Azoretto
Presidente
SMVU

C. Morán
Dr. Carlo Morán
Presidente
Colegio Veterinario
del Uruguay

UruguayNatural Ministerio de Turismo
Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca
Uruguay Presidencia
Intendencia de Montevideo

Declarado de Interés nacional por la Presidencia de la República, por el Ministerio de turismo como turístico, por la Intendencia de Montevideo como Interés departamental y por el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca.

ORGANIZARON
CVU SMVU FVET