

# Puntos prácticos en el control de la Micoplasmosis Aviar

**Raúl O. Cerdá**

Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad Nacional de La Plata  
Calle 60 y 118. La Plata. 1900  
e-mail: [rcerda@fcv.unlp.edu.ar](mailto:rcerda@fcv.unlp.edu.ar)  
ECO Animal Health, UK

## INTRODUCCIÓN

Si bien se han logrado importantes avances en el diagnóstico y control mediante vacunas y medicación estratégica, la Micoplasmosis Aviar (MA) producida por *Mycoplasma gallisepticum* (Mg) y *Mycoplasma synoviae* (Ms), continúa siendo considerada como una de las principales enfermedades relacionadas a pérdidas económicas en la producción avícola. El diagnóstico temprano de esta enfermedad así como la interpretación de los resultados de las pruebas diagnósticas, son de suma importancia a la hora de tomar medidas de control acertadas en una explotación avícola.

El control de esta enfermedad genera muchas controversias entre los expertos y técnicos avícolas. En la mayoría de los países las leyes son muy rigurosas y exigen la eliminación de los planteles de abuelas y reproductoras positivas a Mg y Ms. En otros solo exigen la eliminación de los planteles positivos a Mg teniendo en cuenta la alta capacidad de difusión y prevalencia del Ms y su “baja patogenicidad”, en términos generales. No obstante, muchos países permiten la vacunación de reproductoras y dejan la decisión del sacrificio en manos de los productores, especialmente cuando se trata de integraciones cerradas. Al final de esta presentación se compartirán las ideas propias para un control práctico de estos agentes.

### **Características especiales de los Micoplasmas.**

Los micoplasmas son microorganismos muy simples en su estructura que carecen de pared celular y otros elementos de resistencia como cápsulas, cilias, esporas o plásmidos. No obstante son excelentes parásitos ya que se adhieren a las superficies las mucosas por largos períodos de tiempo o penetran en las células epiteliales donde sobreviven y dividen para luego colonizar otras células (Ley, 2003). Estos mecanismos de sobrevivencia sumado a la capacidad bien estudiada por varios investigadores de variar sus antígenos principales de superficie (Levishon *et al.*, 1995; Noormohammadi *et al.*, 1997), explican la capacidad de evadir el sistema inmune del ave y así persistir en los tejidos de la misma aun cuando estas posean una respuesta inmune fuerte. Esto podría también explicar las reacciones serológicas atípicas encontradas en los lotes de aves infectados. La expresión de antígenos específicos podría ser importante en la producción de antígenos para el monitoreo serológico y para la expresión de virulencia (Kleven, 1998).

## **Diagnóstico de laboratorio:**

### **Aislamiento e identificación.**

El aislamiento de estos microorganismos a partir de la siembra en medios sólidos y líquidos especiales, de hisopados traqueales o articulares de aves sospechosas, es la herramienta más segura y precisa para el diagnóstico (Frey *et al.*, 1968; Yoder, 1975). A pesar de no ser difícil el aislamiento de estas especies a partir de aves en estado agudo de la enfermedad, se requiere un cierto entrenamiento para lograrlo debido a la complejidad de los medios de cultivo, la presencia de micoplasmas saprófitos en las muestras como también bacterias contaminantes. Por otro lado, la obtención de sueros hiperinmunes y reactivos para la identificación de las cepas aisladas es otra dificultad a tener en cuenta. Las posibilidades de aislamiento disminuyen cuando las aves han superado el proceso agudo de la enfermedad. En estos casos los hisopados traqueales son más efectivos para lograr el aislamiento de Ms ya que estos permanecen poco tiempo viable en las articulaciones. Si bien la siembra en caldo es más sensible es preferible realizar inoculaciones directamente sobre placas con medio sólido a fin de evitar el crecimiento de contaminantes y cepas saprófitas que inhiben el desarrollo de los micoplasmas patógenos en los medios líquidos. Las colonias de Mg y Ms desarrollan a partir de 3 o 4 días de incubación a 37°C en cámara húmeda a diferencia de los saprofitos que lo hacen entre 24 y 48 hs. Las colonias presentan la forma característica de “huevos fritos” a la observación con lupa x30 con un tamaño entre 1 a 3 mm, dependiendo de la cantidad y adaptación al medio.

La técnica más rápida, sensible y específica para la identificación de los aislamientos es la inmunofluorescencia directa sobre las colonias aisladas (Baas *et al.*, 1972; Delgiudice *et al.*, 1983). Actualmente esta técnica está siendo reemplazada por la de PCR a partir de la suspensión de colonias sospechosas debido a la dificultad de obtener los conjugados de inmunofluorescencia para Mg y Ms.

### **Interpretación de los resultados.**

Con solo obtener un aislamiento de Mg o Ms de varias muestras analizadas, todo el lote de aves es considerado positivo. Dependiendo de la experiencia del laboratorio, el no aislamiento de cepas del 100% de las muestras analizadas puede no deberse a una real negatividad del lote ya que hay que tener en cuenta todas las variables que afectan el aislamiento mencionadas anteriormente.

### **Diagnóstico serológico.**

Las pruebas serológicas siguen siendo las más empleadas debido a su facilidad de realización, rapidez y costo. Es importante recordar que estas son técnicas “indirectas” de diagnóstico cuyos resultados deben interpretarse en forma poblacional y teniendo en cuenta otros datos del lote (plan de vacunación de las reproductoras, uso de antibióticos, signos clínicos, lesiones macroscópicas, datos zootécnicos, edad de los animales, tipo de explotación, etc.). Las técnicas más empleadas siguen siendo la seroaglutinación rápida

en placa (SAR), el inmunoensayo (ELISA) y la inhibición de la hemoaglutinación (HI). En general se considera que una sola de estas pruebas no es suficiente para un diagnóstico definitivo sino que se complementan en su sensibilidad y especificidad (NPIP, 2009).

La **SAR** continúa siendo la técnica más empleada mundialmente por su costo, facilidad y rapidez de realización. Su mayor ventaja es la alta sensibilidad permitiéndole detectar bajos títulos de anticuerpos, principalmente IgM y en forma temprana (7 a 10 días postinfección). Sin embargo tiene inconvenientes de especificidad ya que puede dar reacciones falsas positivas con sueros de aves vacunadas con bacterinas oleosas o con infecciones de estafilococos y estreptococos (Glisson *et al.*, 1984). En esos casos se debe hacer tratamiento térmico a los sueros (descomplementar) en Baño de María a 56°C por 30 minutos y diluirlos en PBS (las reacciones inespecíficas desaparecen en diluciones del suero de 1/10). Se ha reportado una muy buena sensibilidad y especificidad en esta técnica en estudios epidemiológicos realizados en Inglaterra (Bradbury, 2003). Sin embargo existen reportes de sueros negativos (título < 1:5) pero positivos a HI (Nacimiento *et al.*, 1999). También es común observar reacciones cruzadas suaves en sueros positivos a Ms hacia Mg pero en forma tardía, como así también con *Mycoplasma imitans* (Mi), especie que comparte un alto grado de correlación antigénica con Mg (Bradbury *et al.*, 1993). Los antígenos comerciales disponibles son pocos y varían en cuanto a su sensibilidad y especificidad. Lamentablemente estos escasean en algunos países y por períodos. En nuestro laboratorio hemos observado en varias oportunidades un aumento de reacciones inespecíficas con algunas partidas de antígeno. Esto lo hemos podido solucionar aumentando el tiempo de agitación de los mismos antes de realizar las pruebas y agregando siempre un suero control negativo y uno positivo. Por estas razones esta técnica es generalmente empleada como prueba tamiz o “screening” para la detección de muestras positivas las cuales deben ser luego confirmadas por una técnica serológica de mayor especificidad como el test de ELISA o la prueba de HI. En la actualidad esta técnica se emplea como monitoreo de rutina cada 2 meses en los planteles de aves reproductoras o abuelas y los lotes positivos son luego evaluados por técnicas moleculares como PCR.

La IgM permanece aproximadamente entre 8 y 12 semanas en sangre, por lo tanto no es extraño observar seronegativización de lotes mediante esta técnica en este lapso de tiempo. Por esta razón es una técnica útil para monitorear lotes de aves positivas que estén bajo algún plan medicamentoso.

En caso de detectarse un bajo número de muestras positivas (10 a 20%) se debe repetir el muestreo en unas dos semanas. Teniendo en cuenta la alta transmisibilidad de los micoplasmas, se debería observar un aumento importante en el porcentaje de animales positivos lo cual se interpretaría como una infección activa dentro del lote y como negativo si el porcentaje de positividad disminuye o se mantiene igual.

La técnica de **ELISA** es una técnica muy sensible que detecta IgG, por lo cual es más recomendada para el análisis de pollitos de un día de vida, a los cuales no se

transfiere IgM materna (Opitz *et al.*, 1983; Higgins *et al.*, 1986). Existen varios “kits” comerciales de alta especificidad. Las principales desventajas de esta técnica son su costo, mayor que para SAR, el requerimiento de equipamiento y personal entrenado y la detección más tardía de títulos de anticuerpos (15 a 21 días). El poder contar con un rango amplio de títulos de anticuerpos permite, en ciertos casos, establecer un perfil serológico para aves vacunadas con cepas vivas contra Mg y/o Ms mediante el monitoreo constante de los lotes lo cual permite detectar desafíos de campo por aumentos significativos de los títulos de inmunoglobulinas.

La prueba de **HI** es de muy alta especificidad y se emplea generalmente para confirmar los resultados de SAR y ELISA (Vandarman *et al.*, 1969). Posee baja sensibilidad y detecta IgG entre los 15 y 21 días postinfección. En ocasiones pueden obtenerse falsos negativos debido a la presencia de variantes antigénicas que difieren de las cepas utilizadas como antígenos en la prueba (Avakian *et al.*, 1988). Su mayor inconveniente es la escasa disponibilidad de antígenos comerciales y la difícil obtención de antígenos caseros con altos títulos hemoaglutinantes, en especial para Ms. Su conservación en el laboratorio por largo tiempo es otro serio problema, por lo cual muchos laboratorios especializados utilizan como antígenos cultivos frescos de 24 hs de incubación. La interpretación de los resultados a cabo de los técnicos requiere mucho entrenamiento y la correlación interlaboratorio suele ser baja. Como norma general se considera a una muestra positiva con un título 1:40 y negativa a un título  $\leq$  1:20. Algunos laboratorios prefieren considerar una muestra de suero positiva a partir de un título  $\geq$  1:40. Por los inconvenientes aquí mencionados, sumado a la mayor disponibilidad, sensibilidad y especificidad de los “kits” ELISA y de PCR (García *et al.*, 2005), la prueba de HI se utiliza menos a nivel mundial.

En un trabajo reciente (Feberwee *et al.*, 2005), se estudió la especificidad y sensibilidad de estas 3 técnicas serológicas, el aislamiento y la técnica de PCR. Los resultados obtenidos mostraron un alto porcentaje de muestras positivas en los grupos infectados con cepas homólogas a las detectadas por las pruebas, y un alto porcentaje de muestras negativas (100%) en los grupos no infectados o infectados con cepas heterólogas a las detectadas por las pruebas durante los 35 días posteriores a la infección mediante la prueba de PCR y aislamiento. Los resultados de las pruebas serológicas empleadas en este estudio muestran que en cualquier prueba serológica se puede esperar un cierto número de falsos positivos, especialmente cuando se analizan muestras de aves adultas como las empleadas en este estudio (66 semanas de edad). Aunque se observó una variación en el número de falsos positivos entre varias de las pruebas serológicas, este estudio muestra que no es aconsejable confiar completamente en una sola prueba para la detección de Mg y Ms.

### **Interpretación de la serología de lotes vacunados.**

La principal recomendación o indicación de uso de vacunas vivas contra Mg (cepa F, 6/85 y ts-11) y Ms (MS-H) está dirigida a aves de postura comercial precisamente

teniendo en cuenta las dificultades que estas ocasionan en los planes de vigilancia, ya sea por los mismos productores como por los organismos oficiales de control epidemiológico. Sin embargo y a pesar de esto, son muchas las integraciones de aves livianas y pesadas que están aplicando alguna de estas vacunas a reproductoras en áreas endémicas de Mg y/o Ms. Si bien es muy difícil poder diferenciar una serología positiva por vacunación de una infección de campo, se puede hacer un diagnóstico presuntivo teniendo en cuenta el tipo de vacuna empleada y las pruebas serológicas realizadas. En general estas vacunas generan reacciones serológicas pobres o nulas, siendo la cepa F (100% de positividad entre la 4ta y 6ta semana postvacunación) y MS-H (100% positividad entre la 5ta y 6ta semanas PV) las de mayor reacción serológica seguidas por ts-11 (40% positividad a partir de la 8va semana PV). Normalmente la cepa 6/85 no genera reacción serológica detectable por ninguna de las técnicas descritas (García *et al.*, 2005). En la mayoría de los casos no se detectan reactores por HI y el ELSIA suele dar reacciones positivas varias semanas PV. Mediante el muestreo seriado cada 6 semanas, es posible detectar el momento de desafío con cepas de campo en planteles vacunados correlacionado con un claro aumento de los títulos de ELISA.

### **Técnicas de biología molecular.**

Estas técnicas están dirigidas a la detección de DNA de Mg y Ms a partir de secreciones o tejidos de aves sospechosas. La técnica molecular más empleada en la actualidad es la de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) fundamentalmente para los monitoreos de lotes de abuelas y reproductoras por su alta sensibilidad y rapidez (Lauerman, 1998; Silveira *et al.*, 1996; García *et al.*, 2005). El empleo actual en algunos laboratorios de técnicas de PCR en tiempo real (Real time-PCR) permite obtener resultados con alta especificidad en tan solo una hora (Carli *et al.*, 2003). Recientemente (Callison *et al.*, 2006), se describió el desarrollo y validación de una prueba de PCR en tiempo real utilizando una sonda marcada Taqman (por sus siglas en inglés prueba MGLP) para la detección de Mg. La prueba MGLP demostró ser altamente específica con un límite de detección de 25 copias de DNA por reacción y un límite de cuantificación de 100 copias de DNA por reacción. Esta prueba demostró ser altamente específica, sensible y rápida ya que permitió detectar y cuantificar copias de DNA directamente de las muestras clínicas. Una ventaja a tener en cuenta para esta técnica es que muchas veces se pueden detectar infecciones en forma muy temprana inclusive antes que las aves seroconviertan.

De todos modos, las técnicas de RFLP, REA y RAPD-PCR (Hong *et al.*, 2005) siguen presentando una mayor reproducibilidad y especificidad para estudios de diferenciación de cepas de campo con fines epidemiológicos o para diferenciación de cepas vacunales con cepas de campo. Sin embargo requieren el aislamiento, identificación y purificación previa de las cepas a estudiar.

## **CONTROL DE LA ENFERMEDAD**

Como se dijo al inicio, el control de estos microorganismos es controversial según la interpretación de cada técnico y de las autoridades de control oficiales. Los principales países productores y exportadores mantienen sus plantales de reproductoras libres de Mg. Sin embargo, el control de Ms es en la actualidad un problema creciente. Debido a su alta prevalencia a pesar de las altas medidas de bioseguridad, muchas empresas han comenzado a aplicar planes de control mediante vacunas vivas y/o programas de medicación preventiva. El objetivo no es lograr su erradicación sino simplemente disminuir la transmisión vertical y los efectos nocivos en la producción. Existen muy pocos reportes de erradicación mediante cualquiera de estos medios. Se ha reportado el desplazamiento de cepas de campo mediante el uso de vivas vacunas en forma experimental (Kleven et al, 1998) y un caso de desplazamiento de la cepa F en una granja de postura comercial mediante la vacunación con las cepas ts-11 y 6/85 sucesivamente en lotes consecutivos de aves (Turner et al, 1998). Del mismo modo existe un reporte de erradicación de Ms mediante la aplicación de enrofloxacin y oxitetaciclina (Stanley et al, 2001).

Personalmente he tenido la oportunidad de ver tales resultados en granjas de reproductoras pesadas de varias edades positivas a Ms en países de Sudamérica. El programa estratégico consistió en estos casos en la aplicación de choques en el alimento con una asociación de un antibiótico macrólido con clortetraciclina complejo cálcico basado en el sinergismo observado *in vitro* para este microorganismo (Cerdá et al, 2002).

## **CONCLUSIONES**

El diagnóstico laboratorial de micoplasmas aviáres continua siendo un tema de discusión y estudio para los investigadores de todo el mundo. Los estudios recientes confirman la necesidad de emplear varias de las técnicas aquí desarrolladas para llegar a un diagnóstico confirmativo conociendo el grado de sensibilidad y especificidad de cada técnica. El desarrollo de técnicas muy sensibles y específicas como PCR en tiempo real, cada vez más al alcance de los productores avícolas, permite vislumbrar una solución cercana a todos los problemas de interpretación de las pruebas serológicas. No obstante, estas seguirán brindando un aporte fundamental en el monitoreo rápido y económico de las parvadas siempre que se conozcan sus limitaciones.

Es absolutamente claro que la situación ideal es la de mantener los plantales de reproductoras libres de ambos patógenos teniendo en cuenta la importancia de la transmisión vertical. Esta debería ser una condición indiscutible para proveedores de progenie de broilers o pollitas comerciales. Sin embargo, ¿debe ser esto aplicable también para las integraciones cerradas? ¿Cuál sería el fundamento de esta medida cuando no se aplica a todo el universo de la explotación avícola, especialmente postura comercial de edades múltiples de muy alta prevalencia de ambos micoplasmas? ¿Cuál es el control en aves de traspato, importantes reservorios de Mg y Ms?

A través de varios años de experiencia he podido comprobar en repetidas oportunidades que la gravedad de una infección por micoplasmas depende

fundamentalmente de dos aspectos: a) la virulencia de la cepa actuante y b) el manejo de las aves infectadas. Personalmente pienso que el segundo punto es aun más importante ya que cuando se dan excelentes condiciones de bienestar animal y se mantiene una apropiada integridad del sistema inmune, es posible obtener excelentes resultados productivos aun ante la presencia de cepas agresivas.

Por lo expuesto, considero que el control de Mg y Ms debe basarse en situaciones reales del sistema productivo de cada región y no en utopías incumplibles e innecesarias, sin por ello dejar de trabajar intensamente en las medidas de bioseguridad, manejo y el uso de antimicrobianos de alta calidad o planes vacunales según el criterio técnico de cada explotación.

### Referencias

1. Avakian, A.P., S.H. Kleven and J.R. Glisson, 1988. Evaluation of the specificity and sensitivity of two commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits, the serum plate agglutination test and the hemagglutination-inhibition test for antibodies formed in response to *Mycoplasma gallisepticum*. Avian Dis., 32: 262-272.
2. Baas, E.J. and D.J. Jasper, 1972. Agar block technique NPIP (National Poultry Improvement Plan and Auxiliary for identification of mycoplasmas by use of fluorescent antibody. Appl. Microbiol., 23: 1097-1100.
3. Bradbury, J. M. 2003. Mycoplasma infections still cause problems in Europe. Special Mycoplasma. World Poultry. Magazine on Processing & Marketing. pp 33.
4. Bradbury, J. M., Y. O. S. M. Abdul-Wahab, O. S. M. Yavari, C. A. Dupiellet and J. M. Bové. 1993. Mycoplasma imitans sp. nov. is related to Mycoplasma gallisepticum and found in birds. Int. J. Syst. Bacteriol. Avian Mycoplasmas. 43:721-728.
5. Callison, S. A., S. M. Riblet, S. Sun, N. Ikuta, D. Hilt, V. Leiting, S.H. Kleven, D. L. Suarez and M. Garcia. 2006. Development and validation of a real-time TaqmanH polymerase chain reaction assay for the detection of Mycoplasma gallisepticum in naturally infected birds. Avian Dis. 50:537-544.
6. Carli, K. T. and A. Eyigor. 2003. Real-time polymerase chain reaction for detection of Mycoplasma gallisepticum in chicken trachea. Avian Dis. 47:712-717.
7. Cerdá, R. O.; Petruccelli, M. A.; Landoni, M. F. 2000. Actividad in vitro de Aivlosin (3-acetil, 4"isovaleril tartrato de tilosina) en combinación con clortetraciclina y oxitetraciclina frente a cepas de Mycoplasma synoviae. Jornadas Latinoamericanas de Farmaco-toxicología Veterinaria. Tandil. Bs. As. Argentina.
8. Delgiudice, R. and M. Barile. 1983. Immunofluorescence. In: Methods in Mycoplasmaology. First edition. Academic Press Inc. New York (USA) Vol. I: 431-439.
9. Feberwee, A., D. R. Mekkes, J. J. de Wit, E. G. Hartman and A. Pijpers. 2005. Comparison of culture, PCR, and different serologic tests for detection of Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae infections. Avian Dis. 49:260-268.
10. Frey, M.C., R.C. Hanson and D.P. Anderson, 1968. A medium for the isolation of avian Mycoplasma. Am. J. Vet. Res., 29: 2164-2171. García, M.; Ikuta, N.; Levisohn, S. and S. Kleven. 2005. Evaluation and comparison of various PCR methods for detection of Mycoplasma gallisepticum infection in chickens. Avian Dis. 49 (1): 125-132.
11. García, M., Ikuta, N., Levisohn, S. and S. Kleven. 2005. Evaluation and comparison of various PCR methods for detection of Mycoplasma gallisepticum infection in chickens. Avian Dis. 49 (1): 125-132.

12. Glisson, J. R., Dawe, J. F. and S. K. Kleven. 1984. The effect of oil-emulsion vaccines on the occurrence of nonspecific plate agglutination reactions for *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae*. *Avian Dis* 28: 397-405.
13. Higgins, P. A. and K. G. Whithear. 1986. Detection and differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* antibodies in chicken serum using enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis.* 30: 160- 168.
14. Hong, Y., García, M. Levisohn, S., Savelkoul, P., Leiting, V., Lysnyansky, V., Ley, L. and S. Kleven. 2005. Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* strains using amplified fragment length polymorphism and other DNA-based typing methods. *Avian Dis.* 49 (1): 43–49.
15. Jeffery, N., Gasser, R., Steer, P. and A. Noormohammadi. 2007. Classification of *Mycoplasma synoviae* strains using single-strand conformation polymorphism and high-resolution melting-curve analysis of the *vlhA* gene single-copy region. *Microbiol.*, 153, 2679–2688.
16. Kleven, S.H., 1998. *Mycoplasmas in the Etiology of Multifactorial Respiratory Disease.* *Poult. Sci.*, 77: 1146–1149.
17. Kleven, S.; Fan, H. and K. S. Turner. 1998. Pen trial studies on the use of live vaccines to displace virulent *Mycoplasma gallisepticum* in chickens. *Avian Dis.* 42:300-306.
18. Lauerman, L.H., 1998. *Mycoplasma* PCR assays. In: Lauerman, L.H. (Ed.), *Nucleic acid amplification assays for diagnosis of animal diseases.* American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Ames, IA., pp: 41-42.
19. Levisohn, S., R. Rosengarten, and D. Yogev. 1995. In vivo variation of *Mycoplasma gallisepticum* antigen expression in experimentally infected chickens. *Vet. Microbiol.* 45:219–231.
20. Ley, H.D., 2003. *Mycoplasma gallisepticum* Infection. In: Saif, Y.M. (Ed.), *Diseases of Poultry.* 11th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp. 722–744.
21. Nascimento, E.R., S.M. Ferreira Neto, M.C.M. Galletti., M.G.F. Nascimento., G.B. Lignon and G.A. Mendonça. Chicken *Mycoplasma gallisepticum* infection, diagnosed by agent detection, hemagglutination inhibition, but not agglutination. In: AVMA Conference/AAAP. Meeting, 1999b; New Orleans, USA. p.56.
22. Noormohammadi, A. H., P. F. Markham, K. G. Whithear, I. D. Walker, V. A. Gurevich, D. H. Ley, and G. F. Browning. 1997. *Mycoplasma synoviae* has two distinct phase variable major membrane antigens, one of which is a putative hemagglutinin. *Infect. Immun.* 65:2542–2547.
23. NPIP (National Poultry Improvement Plan and Auxiliary Provision), 2009. In: Title 9: Code of Federal Regulations (9CFR) USDA-APHIS-VS, 1498 Klondike Road, Suite 200, Conyers, GA.
24. Opitz, H. M., J. B. Duplessis and M. J. Cyr. 1983. Indirect micro-enzyme-linked-immunosorbent assay ELISA for the detection of antibodies to *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.* 27: 773-786.
25. Silveira, R.M., L. Fiorentin and E.K. Marques, 1996. Polymerase chain reaction optimization for *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* diagnosis. *Avian Dis.* 40: 218-222.
26. Turner, K. S., and S. H. Kleven. 1998. Eradication of live F strains *Mycoplasma gallisepticum* vaccine using live ts-11 on a multiage commercial layer farm. *Avian Dis.* 42:404-407.
27. Vandarmann, T. H. and H.W. Jr Yoder. 1969. Preparation of *Mycoplasma synoviae* hemmagglutinating antigen and its use in the hemagglutination inhibition test. *Avian Dis.* 13: 654-661.
28. Yoder, H.G. Jr., 1975. *Mycoplasmosis.* In: Hitcher, S.B. (Ed.), *Isolation and identification of avian pathogens.* American Association of Avian Pathologists, College Station, TX., pp: 109-116.