

MICOPLASMOSIS AVIAR (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*)

RESUMEN

Descripción de la enfermedad: La micoplasmosis aviar está causada por varios micoplasmas patógenos, entre los cuales se encuentran *Mycoplasma gallisepticum* (MG) y *M. synoviae* (MS), que se consideran los más importantes.

MG causa una enfermedad respiratoria crónica en las aves domésticas de corra, especialmente cuando las parvadas están estresadas y/o hay otros agentes patógenos respiratorios. La enfermedad se caracteriza por coriza, conjuntivitis, estornudos y sinusitis, particularmente en pavos y aves de caza. Puede originar pérdidas significativas de producción y descenso en la calidad de las aves de abasto, y la pérdida de la producción de huevos. MS puede causar una enfermedad respiratoria, sinovitis, alteración de la cáscara del huevo, pérdida de producción de huevos o pérdida de calidad de la canal, o puede dar lugar a una infección latente causadas por MG y MS. Las cepas de MG varían en infectividad y virulencia, y las infecciones pueden a veces no ser evidentes.

Detección del agente: Se puede identificar MG y MS mediante métodos inmunológicos después de su aislamiento en medios de cultivo para micoplasmas o por la detección de su ADN en muestras de campo o en cultivos.

Las muestras para su aislamiento pueden ser frotis de órganos o tejidos, exudados, homogeneizados tisulares diluidos, obtenidos a partir de los senos infraorbitales, de las articulares, de la yema de huevo o de embriones. Los signos clínicos y las lesiones influirán en la selección de la muestra. Se usan medios líquidos y sólidos combinados con pruebas bioquímicas básicas para el aislamiento y el primer reconocimiento de *Mycoplasma*, pero la identificación a nivel de género y especie se lleva a cabo mediante pruebas inmunológicas (por ejemplo, pruebas de inmunofluorescencia o de inmunoperoxidasa).

En laboratorios especializados se usan métodos de detección de ADN, basados en la reacción en cadena de la polimerasa.

Pruebas serológicas: Para detectar anticuerpos contra MG y MS, se usan varias pruebas serológicas, pero debido a las variaciones de la especificidad y la sensibilidad de las pruebas, se recomiendan dichas pruebas solo para analizar parvadas en vez de animales concretos.

Generalmente, las más usadas son la prueba rápida de aglutinación sérica (RSA), el enzimoanálisis (ELISA) y la prueba de la inhibición de la hemaglutinación (IH). En la prueba RSA, se mezcla el suero con el antígeno marcado producido comercialmente, y los sueros que reaccionan en 2 minutos se calientan a 56°C durante 30 minutos y se vuelven a ensayar. Los sueros que aún reaccionan, especialmente cuando se los diluye, se consideran positivos y se analizan para confirmación mediante ELISA o IH. Existen varios preparados comerciales ELISA con anticuerpos frente a MG y MS.

Requisitos para las vacunas: Aunque el método de control preferido es el mantenimiento de las bandadas libres de MG y MS, para pollos se usan tanto vacunas vivas como inactivadas. La vacunación debe considerarse apropiada sólo en casos específicos según la situación epidemiológica de la zona o la explotación cuando la infección es inevitable. Se usa normalmente para evitar pérdidas en la producción de huevos por ponedoras comerciales, aunque las vacunas también pueden usarse para reducir la transmisión a través de los huevos en núcleos de

reproducción o para favorecer la erradicación de MG en espacios con aves de muchas edades. Es importante vacunar antes de que aparezca el agente natural.

Se dispone de vacunas vivas contra MG para pollos producidas a partir de la cepa F. y de las cepas ts-11 y 6/85, que son cepas no patógenas con sus propiedades de seguridad mejoradas. Es preferible la administración de la cepa F por vía intranasal o mediante una gota en el ojo, aunque también puede administrarse por aerosol o en el agua de bebida. Para la ts-11 se recomienda el método de la gota en el ojo, y para 6/85, la pulverización fina. Las pollitas se suelen vacunar entre las 12 y 16 semanas de edad. Es suficiente con una dosis y las aves vacunadas se convierten en portadoras permanentes. El uso a largo plazo de la cepa F en espacios con aves de diversas edades ocasiona un desplazamiento de las cepas naturales. La cepa ts-11 se ha utilizado para erradicar con éxito la cepa F en las ponedoras comerciales de diversas edades. Durante los últimos años, se han autorizado en varios países vacunas vivas contra MS producidas a partir de la cepa MS-H y MS1. Se aconseja la administración por gota ocular en el caso de la cepa MS-H, mientras que en el caso de la cepa MS1 se aconseja el aerosol fino. Las aves deben vacunarse a las 5 semanas de edad. Se están estudiando nuevas vacunas contra MG, algunas de las cuales con cepas atenuadas y otras desarrolladas con tecnología de virus vectorizado.

En varios países se han autorizado vacunas inactivadas que contienen una suspensión concentrada de MG o MS en una emulsión oleosa. Se deben administrar por vía parenteral a las pollitas de 12–16 semanas de edad. Se recomiendan dos dosis. Las bacterinas de MG son eficaces para evitar las pérdidas en la producción de huevos y la enfermedad respiratoria, pero no evitan la infección con MG natural.

A. INTRODUCCIÓN

1. Descripción e impacto de la enfermedad

Mycoplasma gallisepticum (MG) y *M. synoviae* (MS) pertenecen a la clase *Mollicutes*, orden *Mycoplasmatales*, familia *Mycoplasmataceae*. Sin embargo debe destacarse que *M. meleagridis* y *M. iowae* también pueden causar la enfermedad en aves de corral, aunque se considera que MG y MS son los más importantes de los micoplasmas patógenos y los dos se encuentran en todo el mundo.

MG es particularmente importante en pollos y pavos como causa de enfermedad respiratoria y del descenso de la producción de carne y de huevos (Raviv y Ley, 2013). También puede originar una enfermedad del tracto respiratorio superior en aves de caza. En América del Norte, se ha comprobado que algunas cepas de MG causan conjuntivitis en los pinzones, con impacto importante en poblaciones de aves silvestres, como incapacidad de encontrar alimento, ayuno o muerte, pero no parecer patógenas para las aves de corral. En aves de corral, la infección se transmite verticalmente a través de los huevos infectados y horizontalmente por contacto estrecho; se ha identificado el ácido nucleico de MG en muestras ambientales. Recientemente, se ha comprobado que MG y MS podrían sobrevivir hasta 9 días en fibras sintéticas, pero menos en pelo humano (Abolnik *et al.*, 2014), lo cual demuestra una predisposición de estos micoplasmas a adherirse a las superficies. Otros métodos de contagio están peor documentados.

Los signos clínicos de MG en aves de corral infectadas pueden variar de subclínicos a síntomas respiratorios obvios como coriza, conjuntivitis, tos y estornudos. Puede aparecer exudación nasal, estertores traqueales y soplos a través del pico parcialmente abierto. También puede ser característica una sinusitis unilateral o bilateral, particularmente en pavos y aves de caza, y los senos infraorbitales pueden presentarse tan inflamados que los párpados llegan a cerrarse. La conjuntivitis con exudado ocular espumoso también se ve en pavos, aves de caza y, a veces, en pollos. Los pavos se manchan las plumas de las alas con frecuencia como resultado de los intentos de eliminar el exudado de los ojos. Los pinzones infectados pueden presentar rinorrea y serosidad ocular y los párpados pueden estar inflamados, y haber además, conjuntivitis.

MG se puede asociar con las enfermedades respiratorias agudas en pollos y pavos, especialmente en las aves jóvenes, siendo más susceptibles los pavos. La gravedad de la enfermedad está muy influida por el grado de la infección secundaria con virus tales como el de la enfermedad de Newcastle y el de la bronquitis infecciosa, y con bacterias tales como *Escherichia coli*. En los pavos existe sinergismo con la infección debida al neumovirus aviar. Puede ocurrir una forma más crónica de la enfermedad dando lugar a descensos en la producción de huevos de las reproductoras y las ponedoras.

Las lesiones del tracto respiratorios se manifiestan al principio por un exudado mucoso excesivo y después por una exudación catarral caseosa, que puede formar masas amorfas en los sacos aéreos. En los pavos y aves de caza, los senos infraorbitales se encuentran inflamados y contienen una exudación mucosa o caseosa.

MS puede asociarse a pollos con sinovitis infecciosa; las aves pueden presentar las crestas pálidas, cojeras y crecimiento retardado. Pueden aparecer inflamaciones alrededor de las articulaciones. Con frecuencia se observan excrementos verdosos con grandes cantidades de uratos. Las articulaciones pueden presentar una exudación viscosa, de color entre crema y gris tanto en la propia articulación como a lo largo del recubrimiento de los ligamentos y riñones que aparecen moteados, inflamados. Puede presentarse también hepatomegalia y esplenomegalia (Ferguson-Noel y Noormohammadi, 2013). Los signos respiratorios y las lesiones son similares a las provocadas por MG, excepto que, por lo general, son más leves y, al igual que ocurre con MG, existe sinergismo con otros agentes respiratorios. Las cepas de MS presentan una variabilidad muy importante con respecto a su virulencia y al tropismo por los tejidos (Catania *et al.*, 2016a; Landman, 2014; Landman y Feberwee, 2004). Recientemente, se ha descrito, inicialmente en Europa y más adelante en todo el mundo, una nueva forma clínica que da lugar a una alta tasa de rotura de las cáscaras y a una baja producción de huevos en gallinas ponedoras (Catania *et al.*, 2010; Feberwee *et al.*, 2009a; 2009b). Las lesiones parecen restringirse al ápice de la cáscara y consisten en zonas rugosas oscuras de unos 2 cm de diámetro con bordes claros; además, se ha descrito un descenso en la producción de huevos (Catania *et al.*, 2010; 2016a).

2. Potencial zoonótico y requisitos de bioseguridad y bioprotección

No ha habido informes de infección por MG ni por MS en humanos. Las manipulaciones de laboratorio deben realizarse en base a los procedimientos de bioseguridad y biocontención apropiados, que vendrán determinados por un análisis del riesgo biológico (véase el Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioseguridad: Norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y las instalaciones para los animales*).

3. Diagnóstico diferencial

La enfermedad por MG o MS en pollos puede parecerse superficialmente a una enfermedad respiratoria causada por otros agentes patógenos, como cepas leves del virus de la enfermedad de Newcastle (Capítulo 3.3.14) o el virus de la bronquitis infecciosa aviar (Capítulo 3.3.2), y de hecho, estos también pueden estar presentes en infecciones mixtas por MG o MS. También deben descartarse infecciones por *Avibacterium paragallinarum* o *Pasteurella multocida*. En pollos de engorde, la coinfección por metapneumovirus aviar y *E. coli* podría cursar con características similares. La MG en pavos puede confundirse con infecciones por metapneumovirus aviar y la presencia de sinusitis también puede sugerir una infección por *Bordetella avium*, *Pasteurella multocida*, *Chlamydia* (Capítulo 3.3.1) o MS. La sinovitis infecciosa causada por MS debe diferenciarse de las infecciones de las articulaciones por *Staphylococcus aureus*, *Riemerella anatipestifer*, *Ornithobacterium rhinotracheale* o *Enterococcus* y, en pollos, de la tenosinovitis infecciosa causada por ortoreovirus aviares.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

La presencia de MG o MS se puede confirmar aislando el microorganismo en un medio sin células o detectando directamente su ADN en tejidos infectados o muestras de frotis. También se utilizan mucho las pruebas serológicas para el diagnóstico. Cuando los resultados son dudosos, se ha de realizar un nuevo muestreo en las aves.

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la micoplasmosis aviar (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*) y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Detección del agente¹						
Aislamiento en medios de cultivo	+ ^a	–	+	+	–	–
PCR convencional	+++ ^a	++ ^a	++	+++	++	–
PCR en tiempo real	+++ ^a	+++ ^a	+++	+++	+++	–
PCR-DGGE ^b	+	–	+	+	–	–
Detección de respuesta inmunitaria						
HI	++ ^c	–	+	++ ^e	++	+
RSA	+ ^d	–	+	+ ^e	+	+
ELISA	++ ^c	–	++	++ ^e	++	++ ^f

Clave: +++ = recomendado para este propósito; ++ = recomendado pero tiene limitaciones; + = adecuado en muy pocas situaciones; – = no adecuado para este propósito.

^aNo adecuado para aves de 1 día;

^baplicado en colonias aisladas en medio de cultivo;

^cadecuado para asegurar la ausencia de infecciones en las últimas 2-3 semanas;

^dadecuado para asegurar la ausencia de infecciones en los últimos 5-8 días;

^eadecuado siempre que se puedan analizar muestras apareadas obteniendo la primera y la segunda con unas pocas semanas de diferencia;

^fadecuado solo para el grupo vacunado con vacuna inactivada, con la cepa F y con vacunas termosensibles.

PCR = reacción en cadena de la polimerasa; DGGE = electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización; HI = prueba de inhibición de la hemaglutinación; RSA = aglutinación rápida en suero; ELISA = enzimoimmunoanálisis.

1. Detección del agente

1.1. Cultivo *in vivo*

Se toman muestras de aves vivas, de canales recientes o de canales de aves que fueron congeladas justo después de que el animal muriera. El hisopo traqueal se considera la mejor muestra en animales vivos para cultivar la mayoría de las especies de micoplasmas. Además, con fines de aislamiento, se pueden obtener hisopos de la hendidura coanal. Cuando se dispone de aves muertas, el aislamiento de micoplasmas se puede realizar a partir de hisopos de diferentes tejidos u órganos, como la parte superior y/o media de la tráquea, los pulmones, los alvéolos, el oviducto o las articulaciones.

Se deben obtener hisopos del saco vitelino durante el último tercio del período de incubación del huevo cuando se haya producido una disminución de la incubabilidad de los huevos embrionados (es decir, después del día 15 y del día 20 de incubación en pollos y pavos, respectivamente).

También pueden tomarse las muestras de la superficie interna de la membrana vitelina, y de la orofaringe y los sacos aéreos del embrión.

¹ Se recomienda aplicar una combinación de métodos de identificación a una misma muestra clínica.

Todas las muestras deben analizarse tan pronto como sea posible. Si es necesario el transporte, se deben obtener hisopos que se hayan agitado enérgicamente en 1-2 ml de caldo para micoplasmas y después desecharlos; los tejidos u órganos se deben congelar. Debe incluirse un bloque de hielo o cualquier otro medio de refrigeración, dado que MG y MS mueren rápidamente a temperatura ambiente. Deben realizarse diluciones seriadas de las muestras en caldo de micoplasma porque la presencia de anticuerpos específicos, antibióticos o sustancias inhibidoras en los tejidos puede inhibir el crecimiento de micoplasmas.

Se han formulado varios medios de cultivo adecuados que permiten el crecimiento de micoplasma aviar; asimismo, también pueden adquirirse diversos medios comerciales. Los medios para micoplasmas contienen generalmente proteínas hidrolizadas y una base de infusión de carne suplementada con un suero o una fracción sérica, factores de extracto de levaduras, glucosa e inhibidores bacterianos. Es importante que cada nuevo lote de medio se ensaye con cultivos de MG de un aislamiento reciente y un bajo número de pases *in vitro* porque algunos componentes, especialmente el extracto de levadura y el suero, pueden variar en cuanto a su capacidad para permitir el crecimiento.

En EE.UU. y en otros países es muy frecuente el uso del medio desarrollado por Frey *et al.* para el aislamiento de MG y MS (Frey *et al.*, 1968). La nicotinamida adenín dinucleótido (NAD) es un requisito de crecimiento para el aislamiento primario de MS, pero puede omitirse en el medio para el cultivo de MG.

Los siguientes medios líquidos y sólidos también son satisfactorios:

- i) Parte A: Medio líquido base para microorganismos como los de la pleuroneumonía (grupo PPLO) sin cristal violeta (14,7 g); agua destilada o desionizada (700 ml).
- ii) Parte B: Suero porcino (calentado a 56°C durante 1 hora) (150 ml); 25% (peso/volumen) de extracto de levadura fresco (100 ml); 10% (p/v) de solución de glucosa (10 ml); 5% (p/v) de acetato de talio (10 ml); 200.000 Unidades Internacionales (UI)/ml de penicilina G (5 ml); y 0,1% (p/v) de solución de rojo fenol (20 ml). El acetato de talio puede ser tóxico para el hombre y deben tomarse precauciones para su uso. El pH se ajusta a 7,8. El suero porcino puede sustituirse por suero de caballo, pero es importante comprobar que permite el crecimiento de MG. Para el aislamiento primario de MS en este medio, también se añade una mezcla de un 10% (v/v) de solución NAD (1 ml) y un 10% (v/v) de solución de cisteína (1 ml).

La parte A se autoclava a 121°C, a 1 atmósfera durante 15 minutos y, después de enfriar, se añade la parte B, que ha sido esterilizada previamente por filtración.

Para el medio sólido correspondiente, se añaden 10 g de agar purificado, que permite el crecimiento de micoplasma, a la parte A antes indicada. La mezcla se autoclava como se ha dicho y se mantiene en un baño de agua a 56°C. Los ingredientes de la parte B, omitiendo el rojo fenol, se mezclan separadamente y luego se incuban a 56°C. Las partes A y B se mezclan cuidadosamente para evitar la producción de burbujas y se distribuye el medio en placas de 50 mm usando 7–9 ml/placa. La excesiva humedad superficial puede evitarse con una incubación corta a 37°C. Las placas pueden almacenarse en un recipiente hermético a 4°C hasta 4 semanas.

El extracto de levadura fresco está comercialmente disponible, aunque es preferible prepararlo en el propio laboratorio tomando levadura activa y seca de panadería (250 g) y suspendiéndola en agua destilada (1 litro). Se calienta hasta ebullición, se enfría y luego se centrifuga durante 20 minutos a 3.000 **g**. El líquido sobrenadante se decanta y se ajusta a pH 8,0 con 0,1 M NaOH. Se clarifica mediante filtración o centrifugación, y luego se esteriliza por filtración. El extracto se guarda a –20°C. La glucosa de grado reactivo (10 g) se disuelve en agua destilada o desionizada (100 ml) y se ajusta a pH 7,8–8,0 con 0,1 M NaOH. Se esteriliza por filtración y se guarda a 4°C. El acetato de talio de grado reactivo se disuelve (5 g) en agua destilada o desionizada (100 ml), se esteriliza por filtración y se guarda a –20°C. La solución de penicilina (10⁶ UI de bencilpenicilina en 5 ml de agua destilada) se mantiene a 4°C y se puede almacenar durante 1 semana. En aislamientos realizados a partir de muestras muy contaminadas, se puede aumentar la concentración de la penicilina hasta 2.000 unidades/ml o se puede utilizar alternativamente la ampicilina 0,5–1,0 mg/ml. El rojo fenol (0,1 g) se pulveriza en 0,1 M NaOH (2,8 ml) y luego se lleva a 100 ml con agua destilada estéril y se autoclava a 115°C a 1 atmósfera durante 30 minutos. Se guarda a 4°C. (Nota: el acetato de talio es muy tóxico y se deben tomar precauciones, en especial cuando se prepara la solución stock).

Las muestras se inoculan tanto en medios sólidos como líquidos para micoplasmas. El medio sólido ayuda a detectar colonias de micoplasmas de crecimiento lento, que pueden pasar desapercibidas en los medios líquidos por saprofitos. Puede ser necesario hacer diluciones de hasta 10⁻³ para tener éxito

en el aislamiento. Las placas inoculadas se incuban a 37°C en recipientes sellados. Se ha descrito que aumenta el crecimiento en una atmósfera húmeda y una tensión parcial de CO₂ creciente; estas condiciones se pueden establecer incluyendo un papel o lana de algodón húmedo e inyectando en el contenedor 5–10% de CO₂ en nitrógeno, colocando una vela encendida en el contenedor, o usando una incubadora con CO₂ o un sistema adecuado de generación de gas.

Las tapas de los recipientes del medio líquido deben estar fuertemente ajustadas antes de la incubación a 37°C para evitar cambios indeseables de pH. Durante los primeros días, las placas se han de examinar a diario para detectar la aparición de colonias mediante un microscopio estereoscópico; después se examinan con menor frecuencia. Los cultivos con material de campo deben guardarse hasta al menos 20 días antes de ser desechados.

Los caldos de cultivo deben examinarse diariamente para detectar posibles cambios de color y/o turbidez. La mayoría de los micoplasmas, incluidos MG y MS, metabolizan el ácido productor de azúcar provocando un cambio en el pH del medio de rojo/naranja a amarillo. Otros micoplasmas hidrolizan la arginina creando condiciones alcalinas que provocan un cambio en el pH y, en consecuencia, en el color del caldo de rojo/naranja a rojo fuerte o fucsia. Todo crecimiento observable en el caldo se subcultiva en medio sólido inmediatamente. Si no hay cambio de color después de 7 a 14 días, el caldo debe subcultivarse en medio sólido. Esto debe hacerse porque la presencia de una especie de micoplasma hidrolizadora de arginina (productora de álcali) puede enmascarar el cambio de color ácido producido por MG o MS, o porque puede haber cepas de micoplasma con un metabolismo menos activo.

Por lo general, se pueden reconocer las colonias de micoplasmas en los medios sólidos, aunque puede que no presenten la típica apariencia de “huevo frito”. Pueden aparecer colonias bacterianas en la siembra primaria, pero a menudo son más pigmentadas y no deben parecerse en medios para micoplasmas.

Las reacciones bioquímicas (como la fermentación de la glucosa y la incapacidad de hidrolizar la arginina) pueden ayudar en la identificación, aunque no sean específicas de MG y de MS y sea necesaria la selección del cultivo por clonación.

Para identificar las cepas de micoplasmas, se pueden usar métodos inmunológicos y de detección de ADN. Estos incluyen la prueba de inhibición del crecimiento (GI); y las pruebas de la inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos (IFI) y de la inmunoperoxidasa (IP); las dos últimas se pueden considerar simples, sensibles y específicas. Para las pruebas IC e IM se necesitan cultivos purificados (producidos por una sola colonia), pero no para las pruebas IFI o IP. Estas últimas pueden detectar la presencia de más de una especie de micoplasma, ya que solo las colonias específicas reaccionarán frente al antisuero. No obstante, *M. imitans*, que es una especie de micoplasma que es serológicamente y bioquímicamente similar a MG se ha aislado en algunos países a partir de patos, gansos y a veces de otras especies aviares no domésticas. Se puede diferenciar de MG usando métodos moleculares. Alternativamente, las colonias aisladas se pueden examinar por inmunofluorescencia usando diluciones seriadas de antisueños para MG y *M. imitans* en paralelo. El antisuero homólogo debería tener un título considerablemente más alto.

Los métodos de detección de ADN para identificar directamente MG o MS en tejidos o para identificar aislamientos en el laboratorio se presentan más adelante y normalmente se basan en la técnica de PCR.

Cuando los métodos anteriores no sean concluyentes, pueden ser apropiados la inoculación de embriones de pollo o los bioensayos en pollos vivos. Sin embargo, estas técnicas son costosas y de larga duración y se han reemplazado en gran medida por la tecnología de la PCR, aunque aún constituyen una herramienta útil en la investigación. Las muestras requeridas para la inoculación de embriones de pollo son las mismas que las usadas en la inoculación de medios artificiales. Se preparan en medios líquidos omitiendo el ácido de talio, se incuban a 37°C durante 30–60 minutos, y luego se inoculan alícuotas de 0,05–0,1 ml en el saco vitelínico de varios embriones de pollo de 6–8 días de edad de bandadas que estén libres de micoplasma. Los huevos se examinan al trasluz diariamente y se desechan los embriones que mueren a las 24 horas de la inoculación. Cualquier embrión muerto posteriormente se mantiene refrigerado hasta el cultivo, y los que sobreviven más de 5 días se colocan a 4°C durante 4 horas para matarlos y reducir las hemorragias al abrirlas. La yema se subcultiva en un medio líquido y en otro sólido. Los lípidos de la yema tienden a oscurecer las colonias, de modo que resulta esencial sembrar la yema en estría fina o, preferiblemente, diluirla antes en un medio líquido para micoplasmas.

1.2. Detección de antígeno

Los procedimientos de inmunofluorescencia y de IP para el diagnóstico se aplican generalmente en los aislamientos sospechosos antes que directamente en los exudados o tejidos infectados. Esto se debe a que los microorganismos son demasiado pequeños para reconocerlos de manera concluyente con el microscopio óptico y a que es poco probable que se disponga de las correspondientes muestras control negativo y positivo.

1.2.1. Prueba de inmunofluorescencia indirecta

La técnica recomendada para la prueba IFI (Rosendal y Black, 1972) requiere un cultivo del aislamiento desconocido en un medio sólido que contenga numerosas colonias pequeñas y diferenciadas, un cultivo conocido de MG o de MS como control positivo, y un cultivo de otra especie de micoplasma, como *M. gallinaceum* o *M. gallinarum* como control negativo. También se necesita un suero policlonal anti-MG o MS de conejo, un suero normal de conejo y un suero fluorocromo-conjugado con una anti-inmunoglobulina de conejo. Los sueros se pueden preparar en especies que no sean conejos, pero no se deben usar los anticuerpos monoclonales (MAb) porque MG o MS muestran una expresión variable de sus epítomos superficiales y puede que un MAb no reconozca al microorganismo diana. Las diluciones de trabajo adecuadas en solución salina estéril tamponada con fosfato (PBS; 0,01 M, pH 7,2) del suero anti-MG o MS, y del conjugado se determinan previamente mediante una titulación cruzada, y se seleccionan para su uso diluciones de dos a cuatro veces inferiores a los puntos finales reales. Estas se aplican a colonias de micoplasmas desconocidos que han crecido previamente en placas con agar como se indica a continuación.

1.2.1.1. Procedimiento analítico

- i) A partir de placas con medio sólido que contengan colonias, se cortan en bloques de aproximadamente 1,0 x 0,5 cm y se colocan en portas identificados con las colonias hacia arriba.
- ii) Para permitir después la orientación, se corta la esquina inferior derecha del bloque. En cada porta se pone un bloque con el aislamiento desconocido, un bloque con cultivo conocido de MG, un bloque con el cultivo conocido de MS, y un bloque con un micoplasma diferente, pero conocido. En otro porta, se coloca otro bloque del aislamiento desconocido.
- iii) A la superficie de cada bloque del primer porta se añade una gota de antisuero contra MG (o MS) adecuadamente diluido y se añade el suero normal de conejo al bloque aislado del segundo porta.
- iv) Se incuban todos los bloques 30 minutos a temperatura ambiente en una atmósfera húmeda.
- v) Cada bloque se coloca en un tubo marcado que contenga PBS, pH 7,2, y se lava con cuidado durante 10 minutos sobre un agitador rotatorio, luego se vuelve a lavar como antes, y finalmente se devuelven los bloques a los portas originales para observarlos al microscopio.
- vi) Se absorbe el exceso de humedad de los lados de los bloques. A cada bloque se añade una gota del conjugado diluido, y se incuba y se lava como antes.
- vii) Se devuelven los bloques a sus portas originales, y se examinan las colonias mediante luz incidente usando un microscopio de fluorescencia.

La interpretación de los resultados es subjetiva y requiere alguna experiencia; las comparaciones con los controles son esenciales, y deben presentar las reacciones correctas.

Algunos laboratorios usan antisuero conjugado con fluoresceína en una prueba de inmunofluorescencia directa (IFD). Una técnica muy usada para IFD es aquella en la que los reactivos se aplican sucesivamente dentro de cilindros de acero inoxidable que se colocan en las placas originales con el medio sólido para los micoplasmas. Aunque esto es rápido y fácil de realizar, los resultados obtenidos son menos específicos que mediante el uso del método indirecto, que es, por tanto, el preferido.

1.2.2. Prueba indirecta de la inmunoperoxidasa/inmunounión

Se basa en un principio similar al de la prueba IFI pero la unión de los anticuerpos específicos a las colonias se detecta *in situ* añadiendo una inmunoglobulina anti-conejo que está conjugada con el enzima peroxidasa. Luego se visualiza una reacción positiva añadiendo el sustrato

apropiado que, por oxidación, produce colonias coloreadas. También se puede usar un procedimiento de inmunounión en el que las colonias ensayadas se transfieren a nitrocelulosa (Kotani & McGarrity, 1985) y después reaccionan de una manera similar. Para el serotipado de aislamientos por IP, como por IFI, se deben usar anticuerpos policlonales. La ventaja de la prueba IP sobre la de inmunofluorescencia es que para la prueba IP no se necesita el costoso microscopio de fluorescencia.

1.2.3. Prueba de inhibición del crecimiento

En la prueba IC, se inhibe el crecimiento de los micoplasmas mediante un antisuero específico, lo que posibilita la identificación de la especie. Es una prueba relativamente poco sensible y los sueros deben tener títulos muy altos, ser monoespecíficos y proceder de mamíferos, ya que los sueros de aves no siempre inhiben el crecimiento de los micoplasmas de un modo eficaz. El microorganismo en cuestión ha de estar en cultivo puro (clonado) y se deben probar varias diluciones; la óptima es una concentración de 10^4 unidades formadoras de colonias (UFC/ml). La velocidad de crecimiento del microorganismo puede influir en la inhibición, y es adecuado retardar al principio el crecimiento mediante incubación a 27°C durante 24 horas, y después seguir con otra incubación a 37°C. Los detalles sobre esta prueba y su interpretación se han publicado en otro lugar (Clyde, 1983).

1.3. Métodos moleculares – detección de ácido nucleico

Las PCR se utilizan de forma habitual en muchos laboratorios y se caracterizan por una buena sensibilidad. Estos métodos representan una buena alternativa al cultivo *in vitro* de micoplasmas porque se basan en la detección de secuencias de ADN específicas del agente patógeno directamente en muestras clínicas o cepas cultivadas *in vitro*. El ADN de MG o MS se amplifica mediante PCR utilizando cebadores específicos de especie. La PCR en tiempo real con sondas marcadas con fluorescencia se utiliza cada vez más, acortando el tiempo de detección en comparación con la PCR convencional. Se debe tener mucho cuidado para evitar la contaminación de muestras con ADN de MG o MS de salas de necropsia cercanas, laboratorios de cultivo de micoplasmas o de ciclos de PCR anteriores (véase el Capítulo 2.1.2 *Biología en el diagnóstico de enfermedades infecciosas* y el Capítulo 1.1.9 *Pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación de materiales biológicos destinados a uso veterinario*). Existen varios kits comerciales para PCR y PCR en tiempo real para la detección de MG y MS, y también se han publicado varios procedimientos internos (Dijkman *et al.*, 2017; Raviv y Kleven, 2009).

A continuación se describen una PCR convencional y una PCR en tiempo real para MG y MS. Dentro de los métodos basados en la PCR, la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE) podría aplicarse para la identificación de la mayoría de micoplasmas aviarios, incluidos MG y MS, pero esta prueba está validada solo para cepas procedentes de cultivo de micoplasmas. Este método se describe en el apartado B.1.3.2.

Actualmente, las técnicas de genotipado basadas en el análisis de los genes *mgc2*, *pvpA* y *vlhA* se aplican mucho para la clasificación de cepas de MG (Armor *et al.*, 2015; García *et al.*, 2005) y MS, respectivamente (Hammond *et al.*, 2008). Además, se ha publicado un esquema de tipificación de secuencia multilocus (MLST) del genoma central de *M. gallisepticum* y dos esquemas MLST del genoma central de *M. synoviae* (Dijkman *et al.*, 2016; El-Gazzar *et al.*, 2017; Ghanem *et al.*, 2017) y es probable que se conviertan en herramientas epidemiológicas que se apliquen a nivel mundial.

1.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa convencional

El ensayo descrito es una PCR validada para la detección de MG y MS basada en una amplificación de un fragmento del ARNr de la subunidad 16s (Lauerman, 1998). Se ha descrito otro método muy utilizado basado en el gen *mgc2* para la detección de MG (García *et al.*, 2005). Debe recordarse que cepas no relacionadas pueden ocasionalmente compartir secuencias de ADN y dar bandas de amplificación de ADN en diferentes condiciones de laboratorio. Todas las nuevas PCR requieren validación mediante los criterios del Capítulo 1.1.6 *Principios y métodos de validación de ensayos de diagnóstico para enfermedades infecciosas* y del Capítulo 2.2.3 *Desarrollo y optimización de ensayos de detección de ácidos nucleicos*. La PCR convencional para la EM descrita en este capítulo también puede detectar el ADN de *M. bovirhinis*.

1.3.1.1. Extracción del ADN

El ADN se extrae de las muestras de hisopos (se pueden combinar hasta 10 hisopos) y se suspende en PBS de grado PCR en un tubo Eppendorf de 1,5 ml con tapón a presión. Existen varios kits comerciales de extracción basados en la columna giratoria para la

extracción de ADN de hisopos, tejidos, etc. La extracción automatizada de ADN de *Mycoplasma* es posible con kits comerciales específicos. Se debe seleccionar el kit apropiado para el tipo de muestra y se debe seguir el protocolo del fabricante para la extracción de ADN.

1.3.1.2. Cebadores

Método de PCR	Secuencias de los cebadores para la PCR	Amplificación esperable
ARNr de la subunidad 16s en el caso de MG	MG-14F: 5'-GAG-CTA-ATC-TGT-AAA-GTT-GGT-C-3'	183 pb
	MG-13R: 5'-GCT-TCC-TTG-CGG-TTA-GCA-AC-3'	
<i>mgc2</i> en el caso de MG	MG-1: 5'-CGC-AAT-TTG-GTC-CTN-ATC-CCC-AAC-A-3'	236–302 pb
	MG-2: 5'-TAA-ACC-CRC-CTC-CAG-CTT-TAT-TTC-C-3'	
ARNr de la subunidad 16s en el caso de MS	MS-F: 5'-GAG-AAG-CAA-AAT-AGT-GAT-ATC-A-3'	211 pb
	MS-R: 5'-CAG-TCG-TCT-CCG-AAG-TTA-ACA-A-3'	

1.3.1.3. Reacción en cadena de la polimerasa

- i) La mezcla de reacción debe prepararse, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, en un área limpia independiente utilizando un juego de pipetas específicas. Para cada muestra, se dispensan en un tubo de PCR 45 µl de volumen de mezcla que contengan cada uno de los cebadores a una concentración de 0,4 µM en el caso del ARNr de la subunidad 16s de MS y del gen *mgc2* de MG, o cada uno de los cebadores a una concentración de 0,2 µM en el caso del ARNr de la subunidad 16s de MG. Se podría incluir un control de amplificación interno (IAC), como un kit exógeno comercial o cebadores diseñados para la secuencia endógena (p. ej., ARNr de la subunidad 18S en el caso de muestras derivadas de eucariotas) amplificando en las mismas condiciones de PCR.

La mezcla de reacción debe cubrirse con unas gotas de aceite mineral ligero a menos que el termociclador esté equipado con una tapa caliente. Los tubos se llevan a otra zona limpia, donde se agrega la muestra de ADN extraída correspondiente (5 µl) a cada tubo. En cada ensayo deben incluirse análisis de controles positivos y negativos de ADN. A continuación, los tubos se colocan en un termociclador durante los siguientes ciclos: 40 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 60 segundos, y 1 ciclo (extensión final) de 72°C durante 5 minutos y humedecer a 4°C.

- ii) Para la amplificación de la subunidad 16 s del RNAr de MS y del gen *mgc2* de MG empleando una polimerasa Taq de arranque caliente, se ejecuta el termociclador con el siguiente perfil:

Activación de la polimerasa	95°C	10 minutos	
40 ciclos	95°C	45 segundos	
	54°C	60 segundos	
	72°C	60 segundos	
1 ciclo (extensión final)	72°C	7 minutos	humedecer a 4°C

1.3.1.4. Electroforesis

Los productos de la amplificación por PCR se detectan mediante electroforesis en gel convencional, incorporando los marcadores de tamaño apropiados. Los productos teñidos se visualizan bajo luz ultravioleta o con nitrato de plata bajo una campana para sustancias químicas peligrosas. Como alternativa, el producto amplificado puede procesarse en una máquina de electroforesis capilar cargada con marcadores del tamaño apropiado. El número de pares de bases de los fragmentos amplificados podría ser estadísticamente diferente, aproximadamente un 10% respecto a lo esperado, cuando se utiliza este método. El examen de los productos de la PCR debe realizarse en un área de laboratorio bien separada de los lugares donde se realizan otros pasos del procedimiento de la PCR.

1.3.2. PCR para la amplificación del ADNr de la subunidad 16s y electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante

La técnica 16s-rDNA-PCR-DGGE es un método que se puede aplicar para la identificación de cepas de micoplasma (McAuliffe *et al.*, 2005), incluidos los micoplasmas aviares obtenidos de caldos de cultivo o colonias de agar. También se puede utilizar en extractos de ADN procedentes de muestras clínicas. La diana génica es la región V3 del gen 16s, que se amplifica mediante la combinación de un cebador específico de micoplasma (cebador inverso) y uno bacteriano universal (cebador directo) que contiene una horquilla GC (40 GC repetidos).

Este método se basa en la migración de fragmentos de ADN tras la separación de las cadenas provocada por desnaturalizantes químicos en el gel. Es capaz de detectar mutaciones de una sola base en el ADN.

Después de la migración sobre el gel desnaturalizante, el patrón de las bandas producidas por las muestras problema se compara con el de los controles aviares positivos, que se analizan en paralelo.

Esta técnica es capaz de detectar especies concretas en infecciones y coinfecciones aviares por *Mycoplasma* spp. en una sola muestra (Catania *et al.*, 2014; 2016b).

i) Cebadores

Se utilizan los siguientes cebadores:

R543: 5'-ACC-TAT-GTA-TTA-CCG-CG-3'

GC 341 F: 5'-CGC-CCG-CCG-CGC-GCG-GCG-GGC-GGG-GCG-GGG-GCA-CGG-GGG-GCC-TAC-GGG-AGG-CAG-CAG-3'

ii) Reacción en cadena de la polimerasa

La mezcla para la reacción de PCR debe prepararse en una zona limpia independiente, del siguiente modo (volumen final de 25 µl):

H ₂ O Ultra-pura	12.5 µl
Tampón para PCR 5x	5.00 µl
dNTP (10 mM)	1.00 µl
Cebador F (50 µM)	0.25 µl
Cebador R (50 µM)	0.25 µl
Taq (5 U/µl)	0.25 µl
DMSO (1%)	0.25 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4.00 µl

Se dispensa una mezcla primaria de 23,5 µl en los tubos y luego se añaden 1,5 µl de agua libre de nucleasas/ muestra/ADN control.

Luego, los tubos se colocan en un termociclador para ejecutar el siguiente perfil:

35 ciclos:	95°C	5 minutos	
	95°C	1 minuto	
	58°C	45 segundos	
	72°C	60 segundos	
1 ciclo (extensión final)	72°C	20 minutos	Humedecer a 4°C

iii) Electroforesis

Se cargan 20 µl de cada producto de la PCR en geles de poliacrilamida/bis (37,5: 1) al 10%, con gradientes de desnaturalización del 30% al 60% (donde el 100% es urea 7 M y formamida desionizada al 40% [v/v]) en Tampón TAE 1x. La electroforesis se realiza a 100 V y 300 mA a una temperatura de 60°C durante 18 horas; el tiempo de ejecución podría variar según el dispositivo DGGE y la dimensión del gel. A continuación, los geles se tiñen con una tinción de ADN adecuada durante 30 minutos (5 µl en 50 ml de tampón TAE 1x) y se visualizan con iluminación UV.

1.3.3. PCR en tiempo real

Se han creado PCR en tiempo real específicas de especie para aumentar el rendimiento en la ejecución de la prueba (Raviv y Kleven, 2009). Este método utiliza sondas fluorescentes específicas que aumentan el coste del análisis específico, pero que evitan una posible contaminación posterior a la amplificación. La amplificación de genes de MG tiene por diana el gen *mgc2* y la amplificación de MS en la región intergénica (ISR) 16S-23S. El ensayo se realiza como amplificación dúplex que incluye un control de amplificación interno (IAC). Se determina un límite de detección de 10 copias de ADN de MS por reacción y 1 copia de ADN de MG.

i) Cebadores

Para	Cebadores y sondas
MG	MGFrt F 5'-TTG-GGT-TTA-GGG-ATT-GGG-ATT-3'
	MGRtrr 5'-CCA-AGG-GAT-TCA-ACC-ATC-3'
	MGPrt 5'-Texas Red-TGA-TGA-TCC-AAG-AAC-GTG-AAG-AAC-ACC-BHQ1-3'
MS	MSFrt 5'-CCT-CCT-TTC-TTA-CGG-AGT-ACA-3'
	MSRrt 5'-CTA-AAT-ACA-ATA-GCC-CAA-GGC-AA-3'
	MSPrt 5'-FAM-ATT-CTA-AAA-GCG-GTT-GTG-TAT-CGC-T-BHQ1-3

Se podría incluir un kit de ADN control (IAC) en la mezcla de amplificación para reducir la probabilidad de falsos negativos.

ii) Reacción en cadena de la polimerasa

La amplificación se realiza en tiempo real en un termociclador de 96 pocillos. Se prepara una reacción en tubo para cada muestra que se va a analizar respecto a MG o MS. Cada reacción contiene un total de 25 µl, que comprenden 5 µl de ADN diana, 12,5 µl de mezcla primaria universal para PCR en tiempo real, cada uno de los cebadores finales a una concentración 5 µM y sonda final a una concentración 0,2 µM. Se puede agregar un reactivo IAC a cada reacción siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se utiliza un protocolo de amplificación común:

1 ciclo	95°C	10 minutos	(un único paso de desnaturalización)
45 ciclos:	95°C	15 segundos	
	60°C	30 segundos	

La señal de fluorescencia para la sonda específica de *Mycoplasma* y para el IAC se identifica en el canal apropiado del detector durante el paso de extensión.

Se debe utilizar el valor de ciclo umbral (Ct = ciclo de cuantificación Cq) calculado automáticamente por el software. Los valores de Cq de 35 o inferiores se consideran positivos, y el IAC debe amplificarse en muestras negativas con Cq de entre 30 y 40, de lo contrario podría considerarse inhibido.

1.3.4. Tipificación molecular

También existen diferentes métodos moleculares para la diferenciación de cepas de MG y MS, pero en la actualidad su uso tiende a estar restringido a laboratorios especializados. Se han desarrollado métodos basados en la secuencia para identificar cepas circulantes con el fin de conocer mejor la epidemiología de los micoplasmas y respaldar las medidas de control. Las cepas de MS se pueden identificar y clasificar con métodos como la MLST (Dijkman *et al.*, 2016; El-Gazzar *et al.*, 2017), la secuenciación de *vlhA* 5' y el número de repeticiones ricas en prolina (Hammond *et al.*, 2008), y la diferenciación de MS-H según mutaciones en *obg* y *oppF-1* (Shahid *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2017). Las cepas vacunales se pueden diferenciar con un análisis que permita DIVA (detección de infección en animales vacunados) (Dijkman *et al.*, 2017). Las cepas de MG y MS se pueden discriminar utilizando la MLST de genoma central (Ghanem *et al.*, 2017; Ghanem y El-Gazzar, 2018). Existen otros métodos novedosos, como el MLVA (análisis multilocus de número variable; Kreizinger *et al.*, 2018) y el MAMA (ensayo de detección de mutación por amplificación del desajuste) son muy prometedores para discriminar las cepas naturales de las vacunales, pero aún no están ampliamente disponibles.

Estos nuevos métodos están reemplazando rápidamente a las otras técnicas de tipificación molecular, como el análisis mediante endonucleasas de restricción, la electroforesis en gel de campo pulsado, el análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción o el análisis del ADN polimórfico amplificado aleatoriamente, puesto que son demasiado laboriosos y costosos para la tipificación a gran escala. En base a la gran rapidez de mejora de los nuevos métodos analíticos, así como a la creciente disponibilidad de equipos cada vez más sofisticados, los métodos existente a día de hoy podrían ser reemplazados en poco tiempo. Además, la nomenclatura de las cepas de los micoplasmas aviáres se revisará en un futuro próximo para lograr una clasificación más útil de las cepas circulantes y mejores políticas de control de enfermedades.

2. Pruebas serológicas

Las pruebas serológicas de uso corriente carecen de especificidad o de sensibilidad; es muy aconsejable su uso para controlar bandadas más que para individuos. Quienes deseen usar dichas pruebas para el diagnóstico deben tener en cuenta que ha de establecer un ensayo de sensibilidad y especificidad (capítulo 1.1.6) bajo las condiciones propias de su laboratorio. Debería también resaltarse que estas pruebas no han sido validadas para ser usadas con sueros de aves de varios días o de aves de caza (Bradbury, 2005).

Las pruebas más usadas normalmente son la RSA, el ELISA y la IH. Se han descrito otras como el radioinmunoensayo, la microinmunofluorescencia, la inmunoelectrotransferencia (Welchman *et al.*, 2013) y la prueba de la IP, pero casi nunca se usan. El número de sueros que se han de probar dentro de una bandada depende del nivel de detección y de los límites de confianza que se requieran. Se han descrito requisitos mínimos, incluida la frecuencia de las pruebas para el comercio internacional dentro de la Unión Europea, por ejemplo, para MG, en la Directiva del Consejo 2009/158/EC. También se establecen requisitos mínimos y pruebas aprobadas para los miembros del *National Poultry Improvement Plan* (NPIP) de EE.UU.

Las compañías propietarias de las granjas que usan ELISA para detectar los anticuerpos contra virus en un gran número de sueros pueden encontrar adecuado este tipo de ensayo para los micoplasmas. Los ELISA no se describen aquí con detalle porque están disponibles comercialmente varios sistemas para la detección de MG y MS. En su lugar, se aportan detalles de la prueba IH ya que los reactivos necesarios para esta prueba no tienen una comercialización amplia.

2.1. Prueba rápida de aglutinación sérica

Se recogen sueros de una muestra de la bandada y, si no se ensayan inmediatamente, se mantienen sin congelar a 4°C. La prueba debe realizarse a temperatura ambiente (20–25°C) dentro de las 72 horas posteriores a la recogida del suero utilizando reactivos que deben estar a temperatura ambiente. Una centrifugación previa de los sueros reducirá las reacciones inespecíficas. Los antígenos para RSA se comercializan, pero pueden variar en especificidad y sensibilidad entre los diferentes fabricantes y de un lote a otro. Pueden almacenarse siguiendo las instrucciones de los fabricantes. También se pueden preparar los antígenos adecuados coloreados para RSA de modo "casero" siguiendo los métodos de cultivo descritos en la sección B.1.; estos se tiñen luego con el colorante cristal violeta. A continuación se describen los estándares del control de calidad para antígenos de micoplasma en pruebas serológicas.

2.1.1. Procedimiento analítico (Allan y Gough, 1974)

- i) Se pone un volumen de suero (aproximadamente 0,02 ml) encima de una baldosa limpia blanca o en una placa de cristal, y a continuación se pone un volumen de antígeno MG o MS coloreado. No se ha de permitir que el suero se seque antes de la adición del antígeno. Es importante agitar el recipiente del antígeno vigorosamente y con frecuencia durante su uso para mantener en suspensión la cantidad correcta de antígeno.
- ii) Se extiende la mezcla sobre un área circular de aproximadamente 1,5 cm de diámetro mediante una varilla de vidrio. Se balancea la baldosa o el cristal durante 2 minutos. La aglutinación se advierte por la floculación del antígeno en 2 minutos.
- iii) Se incluyen en la prueba los controles positivos y los negativos conocidos.
- iv) Se vuelven a probar las diluciones seriadas de cualquier suero aglutinante después de calentarlas a 56°C durante 30 minutos. Si todavía reaccionan fuertemente, se consideran positivos si lo hacen diluidos (a 1/4 o más).

En EE.UU. se pueden obtener antisueros positivos de referencia de MG y de MS del USDA National Veterinary Services Laboratories (NVSL), y en Europa de Anses, en Ploufragan¹, Francia. Los sueros control de MG y MS producidos en pollos o en pavos se pueden comprar con varios rangos de titulación. También se pueden comprar preparaciones de antisueros en el Departamento de Medicina Aviar de la Universidad de Georgia, dependiendo de sus disponibilidades.

No hay estándares internacionales para interpretar estas pruebas, pero una proporción alta de sueros positivos en una bandada (10% o más) sugiere una infección por MG, en especial si se confirma por la prueba IH o por ELISA. Para su confirmación, la misma población debería ser analizada de nuevo al cabo de un mes. Cuando los resultados son poco concluyentes se hace necesario el aislamiento del microorganismo y la demostración de la presencia de su ADN. Los resultados dudosos deben investigarse mediante pruebas con antígeno de MS (y viceversa) ya que la infección con estos organismos causa a veces, reacciones cruzadas.

Las pruebas se pueden realizar en la yema o vitelo de los huevos así como en los sueros, aunque la yema debe ser primero diluida o extraída.

2.2. Prueba de la inhibición de la hemaglutinación

MG y MS son capaces de hemaglutinar los hematíes aviares (RBC), que pueden inhibirse mediante anticuerpos específicos en los sueros. Se debe seleccionar una cepa que crezca bien y que hemaglutine con seguridad. La prueba IH requiere un antígeno de MG y de MS que aglutine de forma satisfactoria, unos hematíes frescos lavados de pollo o pavo, según proceda, y el suero problema. El antígeno puede ser un cultivo fresco en un medio líquido o una suspensión lavada y concentrada de células de micoplasma en PBS. El suministro de altos títulos de antígeno por cultivo en medio líquido puede resultar difícil mantener; sin embargo, el uso de antígeno concentrado (que normalmente contiene 25–50% de glicerol y se guarda a –70°C) incrementa la probabilidad de las reacciones inespecíficas. En EE.UU, se puede comprar antígeno para hemaglutinación (HA) de MG y MS en los NVSL.

La prueba IH sigue procedimientos bien conocidos (Allan & Gough, 1974). Se determina primero el título HA del antígeno en diluciones duplicadas sucesivas, definiéndose la unidad HA como la menor cantidad de antígeno que produce una completa HA en el sistema de prueba ensayado. La prueba IH debería realizarse usando 4 unidades de HA por el método siguiente o por un método que tenga una sensibilidad equivalente determinada por pruebas con sueros positivos conocidos.

Todas las titulaciones HA y las pruebas IH se realizan mejor en placas de plástico con multipocillos de fondo en forma de V y usando volúmenes constantes de 50 µl. En cada prueba se incluye un suero control positivo y otro negativo. Se necesita una fila de ocho pocillos para cada suero analizado.

2.2.1. Procedimiento analítico

- i) Se añaden 50 µl de PBS al primer pocillo de cada fila
- ii) Se añaden 8 unidades de HA de antígeno en volúmenes de 50 µl al segundo pocillo de cada fila y se añaden 50 µl de 4 unidades HA de antígeno a cada uno de los pocillos del 3 al 8.
- iii) Se añaden 50 µl de una dilución 1/5 preparada previamente del suero ensayado al primer pocillo, se mezclan y se transfieren 50 µl al segundo pocillo, y así sucesivamente. Se desechan 50 µl del último pocillo. El primer pocillo es el control del suero.
- iv) Se necesitan seis pocillos para el control de antígeno. Se añaden 50 µl de PBS a los pocillos 2 a 6, inclusive, y se añaden 8 unidades HA de antígeno a los pocillos 1 y 2. Se mezcla el contenido del pocillo 2 y se transfiere 50 µl al pocillo 3, se mezcla y se repite hasta el pocillo 6, y se eliminan 50 µl.
- v) Se requieren dos pocillos para el control de hematíes. Se añaden 50 µl de PBS a cada uno de estos.
- vi) Se añaden 50 µl de una suspensión al 0,5% de hematíes (células de pollo para suero de pollo, y de pavo para suero de pavo) a todos los pocillos.
- vii) Se agita suavemente la placa para asegurar que se mezcla bien el contenido de los pocillos, y se evalúa después de dejar que repose aproximadamente 50 minutos a temperatura ambiente o cuando la titulación del antígeno señale 4 unidades HA. Para la

¹ Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (Anses) Ploufragan, Departamento de Bacteriología y Micoplasmiología, 22440 Ploufragan, Francia.

lectura de los resultados, la placa debería inclinarse y se considera que presentan inhibición sólo aquellos pocillos en los que los hematíes "se deslicen" al mismo tiempo que en los pocillos del control de hematíes. El control de suero debería mostrar un claro botón de hematíes y los controles positivos y negativos deberían reaccionar según lo esperado. El título de la IH es la dilución más alta del suero que manifiesta una inhibición completa de la HA.

Los sueros que dan una HA inespecífica deben adsorberse para extraer todas las hemaglutininas inespecíficas de modo que se obtenga un claro botón en el pocillo control sin antígeno HA. La adsorción se realiza incubando 1 ml de dilución sérica con 6–8 gotas de hematíes de pollo o pavo lavados y compactados. Las células se eliminan después de incubar a 37°C durante 10 minutos, y el sobrenadante se ensaya para actividad hemaglutinante.

No hay definición reconocida de resultados negativos o positivos para el comercio internacional.

2.3. Enzimoimmunoanálisis

Existen a la venta varios kits comerciales de ELISA para la detección de anticuerpos contra MG y MS y se utilizan mucho en los laboratorios de diagnóstico. Estos ELISA utilizan diferentes valores de corte y fórmulas matemáticas para convertir el resultado del ELISA en un valor de título. Esto significa que cada ELISA requiere su propia interpretación y, por lo tanto, los resultados de título podría diferir en función del ELISA utilizado.

2.4. Control de calidad de antígenos de *Mycoplasma gallisepticum* y *M. synoviae*

2.4.1 Antígenos de *Mycoplasma gallisepticum*

- i) Antígenos de MG para la prueba RSA

Los métodos de control de calidad que se describen más abajo sólo se aplican a suspensiones de MG teñidas con un colorante apropiado, que contienen un conservante y que están dirigidas a ser usadas con suero en la prueba de aglutinación rápida en placa. Tales antígenos están comercialmente disponibles.

El antígeno debe aparecer como una suspensión homogénea sin flóculos o precipitados cuando se examina al microscopio y el medio líquido de suspensión debe estar libre de colorante residual. Debe ser estéril y con un pH situado entre 6,5 y 7, y debe conservarse a 5±3°C. Debe calentarse a temperatura ambiente antes de usarse.

La sensibilidad y especificidad del antígeno se determina mediante sueros positivos conocidos de títulos alto y bajo, y con sueros negativos conocidos. Una reacción positiva se reconoce por la formación de flóculos coloreados y el aclaramiento del medio de suspensión. Los criterios antes descritos deben seguir aplicándose hasta la fecha de caducidad declarada por el fabricante.

- ii) Antígeno de MG para la prueba HI

Esta prueba se realiza con preferencia con cultivos vivos en crecimiento activo: El antígeno debe estar libre de contaminación por bacterias y hongos.

- iii) Antígeno de MG para ELISA

Puede ser difícil preparar un antígeno satisfactorio para uso en la técnica indirecta de ELISA sin una considerable experimentación previa y la confirmación de la sensibilidad y la especificidad. El uso de un kit comercial validado es el mejor método en la mayor parte de los laboratorios de diagnóstico.

2.4.2. Antígenos de *Mycoplasma synoviae*

Los antígenos se preparan de la cepa WVU 1853 o de otras cepas adecuadas.

- i) Antígeno de MS para la prueba RSA

Las especificaciones son las mismas que para el antígeno MG en la prueba RSA.

- ii) Antígeno de MS para la prueba HI

Las especificaciones son las mismas que para el antígeno MG en la prueba HI.

2.4.3. Otros comentarios

Los sueros que dan reacciones inespecíficas en la prueba RSA no suelen dar una reacción positiva en la prueba IH usando antígeno HA vivo. Las reacciones RSA positivas se pueden confirmar por la prueba de la IH con sueros tomados en las 2–3 primeras semanas después de la infección (el tiempo que tardan en aparecer los anticuerpos IH). Sin embargo, la prueba de la IH suele ser específica de cepa (Kleven *et al.*, 1988) y, por tanto, puede carecer de sensibilidad. La técnica ELISA puede ser una alternativa útil.

En las pruebas RSA no se deben congelar las muestras de suero antes de usarlas. Deben carecer de hemólisis y de contaminación para evitar reacciones inespecíficas. El empleo de vacunas inactivadas para otras enfermedades puede originar reacciones inespecíficas. Las muestras deben ser ensayadas tan pronto como sea posible (dentro de las 72 horas) debido a que los anticuerpos frente a micoplasmas se pueden deteriorar con el tiempo de almacenamiento. Los sueros se pueden inactivar en un baño con agua a 56°C durante 30 minutos.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y EL MATERIAL BIOLÓGICO DE DIAGNÓSTICO

El mejor método de control es mantener las poblaciones libres de MG y MS, aumentar las medidas de bioseguridad y evitar o reducir la producción de micoplasma por parte de los grupos de producción infectados, conteniendo la propagación de estos agentes patógenos por transmisión vertical (Kleven, 2008). La vacunación se debe contemplar sólo en situaciones donde la exposición resulte inevitable, o en casos específicos, como en explotaciones con aves de distintas edades. También hay que considerar la posible exposición de bandadas de aves de corral vecinas.

Para el control de MG y de MS, existen dos tipos de vacunas, las vivas y las inactivadas: Cepas vivas de MG o de MS entre leves y avirulentas y bacterinas inactivadas en emulsión oleosa. Se han publicado varios artículos científicos sobre este tema que proporcionan evidencias de la relación de la vacunación con la reducción de la caída de la producción de huevos, la reducción de los signos respiratorios y la aerosaculitis, y la reducción de la transmisión de huevos.

Aunque existe variabilidad antigénica entre las cepas de MG y de MS, se cree que la vacunación con una sola cepa de MG o MS es suficiente para lograr un buen nivel de protección frente a las especies homólogas. Las vacunas vivas pueden considerarse una herramienta buena y eficaz para la gestión y la contención de la micoplasmosis. Sin embargo, hasta hace poco, no era fácil distinguir las cepas vacunales de las cepas naturales utilizando las pruebas que existían (Catania, 2016b). Sin embargo, las técnicas biomoleculares más nuevas, aunque no son simples ni fáciles, han sido validadas para diferenciar cepas (Dijkman *et al.*, 2017; Kreizinger *et al.*, 2017), aunque generalmente se basan en mutaciones de un solo punto.

En el capítulo 1.1.8 *Principios de producción de vacunas veterinarias* se recogen las directrices para la producción de vacunas veterinarias. Las indicadas aquí y en el capítulo 1.1.8 son de carácter general y pueden requerir suplementación según los requisitos nacionales y regionales.

Las vacunas a base de bacterias se utilizan para preparar el sistema inmunitario para la exposición a la enfermedad a fin de reducir los signos clínicos, como las caídas en la producción de huevos que se producen como consecuencia de la infección por MG en ponedoras. Su uso en la actualidad se limita principalmente a MG.

El uso de vacunas vivas equivale a una "exposición controlada". La finalidad es infectar la bandada con una cepa inmunogénica de MG o MS suave a una edad en la que ocurra poco o ningún daño. Dicha exposición origina resistencia frente a una infección posterior en la vida, sobre todo en explotaciones comerciales con aves de distintas edades. Las aves vacunadas con éxito deberían ser resistentes a la enfermedad respiratoria, la saculitis, los descensos en la producción de huevos u otras lesiones específicas causadas por MG o MS. La vacunación también debería proporcionar una disminución de la transmisión del agente patógeno a través del huevo en los reproductores.

1. Descripción de la producción y requisitos mínimos para las vacunas

1.1. Características del inóculo

1.1.1. Vacuna viva

La cepa vacunal debe ser inmunogénica, debe colonizar el tracto respiratorio superior y causar el mínimo daño al sistema respiratorio. Una fuerte respuesta de los anticuerpos no se correlaciona necesariamente con la inmunidad.

Los inóculos de cultivo deben estar libres de agentes extraños. El cultivo debe ser clonado para asegurar su pureza. Si se desea, se pueden desarrollar los perfiles de ADN del micoplasma con endonucleasas de restricción u otros métodos, como la DGGE del producto de la PCR de la subunidad 16s, para asegurarse de la identidad y pureza de la cepa.

Los cultivos de inóculo deben ser estables y sin tendencia a la reversión de la virulencia. Esto se puede confirmar mediante diez pases en pollos susceptibles. Se pueden introducir pollos testigo a intervalos semanales. Si es necesario, se pueden tomar frotis traqueales de pollos infectados e introducirlos luego en la tráquea de los pollos testigo. Debe demostrarse la transmisión del organismo. El aislamiento resultante se puede usar a continuación para infectar pollos susceptibles.

1.1.2. Vacunas muertas

Las características más importantes de las vacunas muertas son un alto rendimiento y una buena antigenicidad. Se supone, aunque no esté probado, que son mejores las cepas virulentas. Los inóculos de cultivo deben estar libres de organismos contaminantes.

1.2. Método de cultivo

El inóculo de cultivo se puede propagar en un medio similar al descrito anteriormente (sección B.1.). Para las vacunas vivas el cultivo líquido se liofiliza o se congela a -70°C o a más frío. Para las bacterinas, el cultivo se debe concentrar y resuspender en un pequeño volumen de solución salina o PBS antes de preparar la emulsión.

1.3. Validación como vacuna

Antes de la producción masiva de la vacuna se deben obtener datos sobre su eficacia. Los pollos se deben vacunar por la misma vía que la usada en condiciones de campo. Las aves vacunadas deben ser expuestas y su protección determinada teniendo en cuenta los síntomas respiratorios, la rinorrea, y/o la saculitis. Idealmente, se debe evaluar la protección respecto a la pérdida de producción de huevos, pero tales intentos son caros e incómodos de realizar.

Eficacia de la prueba: Se vacunan grupos de 20 pollos libres de patógenos específicos (SPF) o al menos libres de micoplasmas, de 2 semanas de edad o mayores mediante una gota en el ojo u otra vía de administración con una dosis de campo de la vacuna viva, o subcutánea o intramuscularmente con una dosis de bacterina (normalmente 0,5 ml). Se mantiene aislado un grupo similar de pollos no vacunados como control. Todos los pollos se exponen a un cultivo líquido de 24 horas de una cepa virulenta de MG, a las 2–3 semanas después de la vacunación. Un método simple de exposición es la inoculación de 0,1 ml de un cultivo de descarga en el saco aéreo torácico posterior. Después de 7–10 días del desafío, se realiza la necropsia a todos las aves y se anotan las lesiones en los sacos aéreos. Otros métodos alternativos son la prueba por inoculación de 0,1 ml en el seno infraorbitario y el examen de la rinorrea en las aves después de un período de entre 7 y 14 días o aplicarla mediante un aerosol y medir el grosor de la mucosa traqueal en secciones microscópicas de cuatro o seis puntos equidistantes predeterminados (Whithear, 1996).

1.4. Método de producción

1.4.1. Procedimiento

La vacuna debe producirse en ambientes limpios y seguros, bien separados de los servicios de diagnóstico o de la producción comercial. Debe tenerse especial cuidado en evitar la contaminación por MG de otros productos producidos en los mismos servicios.

La producción de la vacuna debe realizarse mediante un sistema de siembra por lotes, con una cepa adecuada de MG de origen e historia del cultivo y pureza conocidos. El medio de cultivo es similar al indicado anteriormente. El suero empleado en el medio de crecimiento debe inactivarse a 56°C durante 1 hora para evitar la contaminación con algún micoplasma presente, y esterilizarse por filtración. Es aconsejable proveerse de suero SPF.

Se inocula el medio líquido con un inóculo de crecimiento rápido en una proporción aproximada del 5% (v/v). Se incuba a 37°C . La producción puede ser discontinua, usando grandes contenedores o en un fermentador. Si se trata de cultivos discontinuos, estos se recogen después de aproximadamente 24 horas de incubación. Las vacunas vivas se conservan mediante liofilización o por congelación a -70°C en nitrógeno líquido o en hielo seco.

Para la producción de bacterinas, se debe concentrar el antígeno, normalmente mediante centrifugación, ultrafiltración u otro método adecuado. Las bacterinas se presentan como emulsiones de agua en aceite, por lo general con 80 de aceite mineral, 20% de fase acuosa, y con un agente emulsionante apropiado.

1.4.2. Requisitos para los ingredientes

Véase el Capítulo 1.1.8, y sobre todo lo relativo a los productos de origen biológico procedentes de países con riesgo insignificante de encefalopatías espongiiformes transmisibles.

1.4.3. Controles durante el proceso

i) Contenido en antígeno

El título debería ser de 10^8 a 10^9 ufc /ml cuando se recoge. La concentración antigénica de las bacterinas es difícil de estandarizar pero se puede basar en el volumen celular comprimido, que normalmente es de un 1% (v/v) de células comprimidas en el producto final.

ii) Inactivación de vacunas

Inactivación de vacunas muertas con frecuencia la inactivación se hace con beta-propiolactona o formaldehído. El agente inactivador y el proceso de inactivación bajo las condiciones de producción de vacunas debe lograr la inactivación del microorganismo vacunal y de los contaminantes potenciales.

Antes de la inactivación, se debe procurar una suspensión homogénea exenta de partículas que resulten impenetrables al agente inactivador. Debe realizarse una prueba de inactivación por cultivo en medio líquido para micoplasmas de cada lote, tanto del producto recogido en masa como del producto final. No debería observarse ningún crecimiento de micoplasmas.

iii) Esterilidad de las vacunas inactivadas

El aceite usado en las vacunas debe esterilizarse calentando 1 hora a 160°C o por filtración, y el proceso debe ser eficaz. Las pruebas adecuadas para las vacunas en emulsión de aceite se realizan en cada lote de las vacunas finales como se indica, por ejemplo, en la British Pharmacopoeia (Veterinary) 1985.

1.4.4. Control por lotes

i) Esterilidad

Las pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario se encuentran en el capítulo 1.1.9.

ii) Inocuidad

a) Prueba de inocuidad en vacuna viva

Las aves vacunadas en la prueba de eficacia expuesta anteriormente se pueden usar para evaluar la seguridad de la vacuna.

b) Prueba de inocuidad en vacuna inactivada

Las aves vacunadas en la prueba de eficacia anteriormente expuesta se pueden observar para efectos locales adversos o efectos sistémicos.

iii) Potencia del lote

Las pruebas de potencia de vacunas vivas o inactivadas se pueden llevar a cabo por los procedimientos considerados anteriormente para la prueba de eficacia. El título de las vacunas vivas debe ser suficiente para inducir una infección por la vía recomendada por el fabricante, mediante la dosis administrada a cada ave, de manera que dure hasta la fecha de caducidad.

iv) Estabilidad

Se debe comprobar en tres lotes de vacunas que la vacuna supera la prueba de estabilidad 3 meses después de la duración requerida.

1.5. Requisitos para la aprobación del registro

1.5.1. Proceso de fabricación

Para la aprobación de la vacuna, deben enviarse a las Autoridades todos los detalles relevantes relacionados con la fabricación de la vacuna y las pruebas de control de calidad (véanse los apartados C.2.1 y 2). Se debe proporcionar información de tres lotes consecutivos de vacunas para demostrar la uniformidad de la producción.

1.5.2. Requisitos de inocuidad

i) Precauciones (peligros)

Las vacunas con emulsiones de aceite causan grave daño al vacunador si se inyectan accidentalmente en la mano u otros tejidos. En caso de accidente, la persona debe ir de inmediato a un hospital, tomando consigo una muestra de la vacuna. Cada frasco y embalaje de vacuna debe estar marcado con una advertencia sobre las serias consecuencias de la auto-inyección accidental. Tales heridas deben ser tratadas por el doctor como una "lesión por inoculación de grasa".

El personal implicado en la vacunación de aves con vacunas vivas por aerosol debe llevar ropa de protección y mascarillas.

1.5.3. Requisitos de eficacia

Para registrar una vacuna comercial, deberá demostrarse la eficacia (protección) en un lote o lotes producidos según el método estándar y que contengan la cantidad mínima de antígeno o valor de potencia; cada lote comercial futuro se probará antes de su liberación para asegurarse de que tiene el mismo valor de potencia que el lote o los lotes utilizados para las pruebas de eficacia. Cada lote de vacuna viva debe contener suficientes micoplasmas vivos por cada dosis destinada a un ave como para durar hasta la fecha de caducidad.

La eficacia (protección) de la vacuna debe estimarse directamente en los animales vacunados mediante la evaluación de su resistencia a la exposición.

BIBLIOGRAFÍA

- ABOLNIK C. & GOUWS J. (2014). Extended survival times of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* on kanekalon synthetic hair fibres. *Poult. Sci.*, **93**, 8–11 (doi: 10.3382/ps.2013-03457).
- ALLAN W.H. & GOUGH R.E. (1974). A standard haemagglutination test for Newcastle disease. 1. A comparison of macro and micro methods. *Vet. Rec.*, **95**, 120–123.
- ARMOUR N.K. & FERGUSON-NOEL N. (2015). Evaluation of the egg transmission and pathogenicity of *Mycoplasma gallisepticum* isolates genotyped as ts-11. *Avian Pathol.*, **44**, 296–304 (doi: 10.1080/03079457.2015.1044890).
- BRADBURY J.M. (2005). Workshop of European Mycoplasma Specialists. *World Poult. Sci. J.*, **61**, 355–357.
- CATANIA S., BILATO D., GOBBO F., GRANATO A., TERREGINO C., IOB L. & NICHOLAS R.A. (2010). Treatment of eggshell abnormalities and reduced egg production caused by *Mycoplasma synoviae* infection. *Avian Dis.*, **54**, 961–964.
- CATANIA S., GOBBO F., BILATO D., GAGLIAZZO L., MORONATO M.L., TERREGINO C., BRADBURY J.M. & RAMÍREZ A.S. (2016a). Two strains of *Mycoplasma synoviae* from chicken flocks on the same layer farm differ in their ability to produce eggshell apex abnormality. *Vet. Microbiol.*, **193**, 60–66 (doi: 10.1016/j.vetmic.2016.08.007).
- CATANIA S., GOBBO F., RAMIREZ A.S., GUADAGNINI D., BALDASSO E., MORONATO M.L. & NICHOLAS R.A. (2016b). Laboratory investigations into the origin of *Mycoplasma synoviae* isolated from a lesser flamingo (*Phoeniconaias minor*). *BMC Vet. Res.*, **12**, 52 (doi: 10.1186/s12917-016-0680-1).
- CATANIA S., GOBBO F., RODIO S., QUALTIERI K., SANTONE C. & NICHOLAS R.A. (2014). First isolation of *Mycoplasma iowae* in grey partridge flocks. *Avian Dis.*, **58**, 323–325.
- CLYDE W.A., JR. (1983). Growth inhibition tests. *In: Methods in Mycoplasmaology*, Vol. 1, Razin S. & Tully J.G., eds. Academic Press, New York, USA, and London, UK, 405–410.

- DIJKMAN R., FEBERWEE A. & LANDMAN W.J. (2016). Development and evaluation of a multi-locus sequence typing scheme for *Mycoplasma synoviae*. *Avian Pathol.*, **45**, 426–442 (doi: 10.1080/03079457.2016.1154135).
- 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 Pathol.*, **46**, 403–415 (doi: 10.1080/03079457.2017.1296105).
- 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 Dis.*, **61**, 25–32 (doi: 10.1637/11417-040516-Reg).
- FEBERWEE A., MORROW C.J., GHORASHI S.A., NOORMOHAMMADI A.H. & LANDMAN W.J. (2009a) Effect of a live *Mycoplasma synoviae* vaccine on the production of eggshell apex abnormalities induced by an *M. synoviae* infection preceded by an infection with infectious bronchitis virus D1466. *Avian Pathol.*, **38**, 333–340 (doi: 10.1080/03079450903183652).
- FEBERWEE A., DE WIT J.J. & LANDMAN W.J.M. (2009b). Induction of eggshell apex abnormalities by *Mycoplasma synoviae*: field and experimental studies. *Avian Pathol.*, **38**, 77–85.
- FERGUSON-NOEL N. & NOORMOHAMMADI A.H. (2013). *Mycoplasma synoviae* infection. In: Diseases of Poultry, 13th Edition, Swayne David E., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Suarez D.L. & Nair V.L., eds. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA and Oxford, UK, 900–906.
- FREY M.L., HANSON R.P. & ANDERSON D.P. (1968). A medium for the isolation of avian Mycoplasmas. *Am. J. Vet. Res.*, **29**, 2163–2171.
- 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 Dis.*, **49**, 125–132.
- GHANEM M. & EL-GAZZAR M. (2018) Development of *Mycoplasma synoviae* (MS) core genome multilocus sequence typing (cgMLST) scheme. *Vet. Microbiol.*, **218**, 84–89 (doi: 10.1016/j.vetmic.2018.03.021).
- GHANEM M., WANG L., ZHANG Y., EDWARDS S., LU A., LEY D. & EL-GAZZAR M. (2017). Core Genome Multilocus Sequence Typing: a Standardized Approach for Molecular Typing of *Mycoplasma gallisepticum*. *J. Clin. Microbiol.*, **56**, e01145-17 (doi: 10.1128/JCM.01145-17).
- HAMMOND P.P., RAMÍREZ A.S., MORROW C.J. & BRADBURY J.M. (2008). Development and evaluation of an improved diagnostic PCR for *Mycoplasma synoviae* using primers located in the haemagglutinin encoding gene *vlhA* and its value for strain typing. *Vet. Microbiol.*, **136**, 61–68 (doi: 10.1016/j.vetmic.2008.10.011).
- KLEVEN S.H. (2008). Control of avian mycoplasma infections in commercial poultry. *Avian Dis.*, **52**, 367–374.
- KLEVEN S.H., MORROW C.J. & WHITHEAR K.G. (1988). Comparison of *Mycoplasma gallisepticum* strains by hemagglutination-inhibition and restriction endonuclease analysis. *Avian Dis.*, **32**, 731–741.
- KOTANI H. & MCGARRITY G.J. (1985). Rapid and simple identification of Mycoplasmas by immunobinding. *J. Immunol. Methods*, **85**, 257–267.
- KREIZINGER Z., SULYOK K. M, BEKŐ K., KOVÁCS Á. B., GRÓZNER 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. *Vet. Microbiol.*, **226**, 41–41.
- KREIZINGER Z., SULYOK K.M., GRÓZNER D., BEKŐ K., DÁN Á., SZABÓ Z. & GYURANECZ M. (2017). Development of mismatch amplification mutation assays for the differentiation of MS1 vaccine strain from wild-type *Mycoplasma synoviae* and MS-H vaccine strains. *PLoS One.*, **12**, e0175969 (doi: 10.1371/journal.pone.0175969)
- LANDMAN W.J. (2014). Is *Mycoplasma synoviae* outrunning *Mycoplasma gallisepticum*? A viewpoint from the Netherlands. *Avian Pathol.*, **43**, 2–8 (doi: 10.1080/03079457.2014.881049).
- LANDMAN W.J.M. & FEBERWEE A. (2004). Aerosol-induced *Mycoplasma synoviae* arthritis: the synergistic effect of infectious bronchitis virus infection. *Avian Pathol.*, **33**, 591–598.

LAUERMAN L.H. (1998). *Mycoplasma* PCR Assays. In: Nucleic Amplification Assays for Diagnosis of Animal Diseases, Lauerman L.H., ed. American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Auburn, AL, USA, 41–52.

MCAULIFFE L., ELLIS R., LAWES J., AYLING R.D. & NICHOLAS R.A.J (2005). 16S rDNA and DGGE: a single generic test for detecting and differentiating *Mycoplasma* species. *J. Med. Microbiol.*, **54**, 731–739.

RAVIV Z. & KLEVEN S.H. (2009). The development of diagnostic real-time TaqMan PCRs for the four pathogenic avian mycoplasmas. *Avian Dis.*, **53**, 103–107.

RAVIV Z. & LEY D.H. (2013). *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: Diseases of Poultry, 13th Edition, Swayne David E., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Suarez D.L. & Nair V.L., eds. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA and Oxford, UK, 877–893.

ROSENDAL S. & BLACK F.T. (1972). Direct and indirect immunofluorescence of unfixed and fixed mycoplasma colonies. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. [B]*, **80**, 615–622.

SHAHID M.A., MARKHAM P.F., MARKHAM J.F., MAREDA M.S. & NOORMOHAMMADI A.H. (2013). Mutations in GTP binding protein Ogb of *Mycoplasma synoviae* vaccine strain MS-H: implications in temperature-sensitivity phenotype. *PLoS One*, **8**(9), e73954 (doi: 10.1371/journal.pone.0073954).

WHITHEAR K.G. (1996). Control of avian mycoplasmoses by vaccination. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **15**, 1527–1553.

WELCHMAN D. DE B., AINSWORTH H L. JENSEN T.K., BOYE M., KING S.A. KOYLASS M.S. WHATMORE A.M., MANVELL R.J., AYLING R.D. & DALTON J.R. (2013). Demonstration of *Ornithobacterium rhinotracheale* in pheasants (*Phasianus colchicus*) with pneumonia and airsacculitis. *Avian Pathol.*, **42**, 171–178.

ZHU L., KONSAK B.M., OLAOGUN O.M., AGNEW-CRUMPTON R., KANCI A., MAREDA M.S., BROWNING G.F. & NOORMOHAMMADI A.H. (2017). Identification of a new genetic marker in *Mycoplasma synoviae* vaccine strain MS-H and development of a strategy using polymerase chain reaction and high-resolution melting curve analysis for differentiating MS-H from field strains. *Vet. Microbiol.*, **210**, 49–55. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.08.021. Epub 2017 Sep 1.

*
* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la micoplasmosis aviar (*Mycoplasma gallisepticum* y *M. synoviae*) (puede consultarse la página web de la OIE: <https://www.oie.int/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>) Por favor, contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE para información adicional sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la micoplasmosis aviar (*Mycoplasma gallisepticum* y *M. synoviae*)

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1991 COMO MICOPLASMOSIS AVIAR (*MYCOPLASMA GALLISEPTICUM*);
ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2021.