



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

“AISLAMIENTO DE
Mycoplasma synoviae y *Mycoplasma gallisepticum*
DE AVES COMERCIALES EN MEXICO.
IDENTIFICADO MEDIANTE
INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA.

T E S I S

Que para obtener el título de:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P r e s e n t a :

Luis Alberto Etcharren Márquez

Asesores: MVZ Luz María Rodríguez López
MVZ Miguel Angel Ceniceros Ruiz

Ciudad Universitaria, D. F.,

1992

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESUMEN

ETCHARREN MÁRQUEZ LUIS ALBERTO: Aislamiento de Mycoplasma synoviae y M. gallisepticum DE AVES COMERCIALES EN MÉXICO. IDENTIFICADOS MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA. (bajo la dirección de: Luz María Rodríguez López y Miguel Angel Ceniceros Ruíz).

Se tomaron al azar 3 muestras de sacos aéreos y 7 de tráqueas para inoculación en el medio de FREY, a partir de pollos de 15 parvadas comerciales de los Estados de México, Morelos y Querétaro. Se obtuvo el aislamiento de una cepa de Mycoplasma synoviae a partir de tráqueas de pollitos de 6 días de edad provenientes del estado de Morelos. Se identificó esta cepa mediante la técnica de inmunofluorescencia directa. Además, con la finalidad de inhibir el crecimiento de bacterias contaminantes se formaron 5 grupos (grupos del 11 al 15) en los que se modificó la concentración del antibiótico utilizada. Dentro de estas bacterias se logró identificar Proteus spp., Pasteurella spp., Staphylococcus spp., y Escherichia coli. Encontrando que la concentración mínima inhibitoria de ampicilina fué de 3.5 mg por ml de medio líquido. Se considera este experimento como un adelanto en la aplicación de esta técnica en México, sin embargo es necesario estandarizar la técnica para contar con ella en un futuro cercano como una herramienta de diagnóstico rápida y precisa.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
MATERIAL Y MÉTODOS.....	11
RESULTADOS.....	14
DISCUSIÓN.....	15
APENDICE.....	18
LITERATURA CITADA.....	20

INTRODUCCIÓN

La micoplasmosis es una de las enfermedades respiratorias más importantes y de mayor incidencia a nivel mundial. En México se presenta la enfermedad en todo el territorio nacional, se ha observado que puede afectar aves de 6 días de edad en adelante y causar considerables pérdidas económicas. Es común observar la presentación de brotes después de la vacunación contra enfermedades virales como bronquitis infecciosa aviar, laringotraqueitis aviar y newcastle, o bien cuando existen factores predisponentes, especialmente una alta concentración de amoniaco, alta densidad de población y estados de tensión.(9,12,18)

En 1930, Dodd reporta en Inglaterra una entidad patológica que llama pneumoenteritis epizootica, posteriormente en 1938 Dickinson y Hinshaw cambian este nombre por el de sinusitis infecciosa de los pavos. En 1935 Nelson hace el primer reporte de la enfermedad en pollos y en 1943 Delaplane y Stuart describen la enfermedad Crónica Respiratoria. Es a principios de los años 50's que Markham, Wong, Van Roekel y Olesiuk describen simultáneamente el aislamiento de un microorganismo de pollos y pavos, similar a lo que ahora conocemos como micoplasma.(16,20,21)

En la actualidad se conocen 20 especies de micoplasmas aviáres, de los cuales se consideran únicamente de importancia patógena a tres: Mycoplasma synoviae (Ms)

Mycoplasma gallisepticum (Mg) y Mycoplasma meleagridis (Mm), los cuales pertenecen a la familia Mycoplasmataceae. (5,17,18,21).

Los micoplasmas son organismos procaríotes de vida libre, anaerobios facultativos y de crecimiento lento, que carecen de pared celular y en general su membrana celular es similar a la de células eucariotes con la particularidad que el micoplasma integra derivados de colesterol a su membrana dando a ésta una estabilidad osmótica para sobrevivir; siendo esta característica metabólica única entre procaríotes. (6,7,10,12,17,21)

Estos microorganismos son considerados como los más pequeños de vida libre que se conocen, con un diámetro de 0.3 a 0.8 micrometros. La división del genoma del micoplasma no siempre está sincronizada con la división celular por lo que se pueden observar filamentos multigenómicos con aproximadamente 650 genes que es la mínima cantidad para un organismo vivo. Pueden ser observados al microscópio apareciendo como cocos Gram negativos, sin embargo generalmente se tiñen con Giemsa. La morfología de las colonias en medios sólidos sugieren pequeñas gotas de rocío, redondas, delgadas y translúcidas con o sin prominencias centrales. El crecimiento se puede observar entre 3 y 7 días pos-cultivo en los medios selectivos para este microorganismo. (6,7,22). Además de

esto, los micoplasmas tienen una fuerte capacidad hemoaglutinante y de hemoadsorción. Mycoplasma synoviae puede presentar variantes en cuanto a su patogenicidad, pero sólo se conocen dos cepas: 1853 WVU y la F10-2AS, a su vez del Mycoplasma gallisepticum se distinguen varias cepas: A5969, S, F, y R. (6,7,10,12,17,21)

El período de incubación varía de acuerdo a la patogenicidad del microorganismo y a la cantidad del inóculo, pero en general es más corta en la transmisión transovárica (6-11 días) que en la transmisión horizontal (11-21 días). (6,17,18)

La morbilidad varía entre un 2% y un 75% pero se considera que en una parvada afectada el 100% de las aves están infectadas. La transmisión de esta enfermedad puede ser tanto vertical (transováricamente), siendo esta vía la más importante, como horizontal (contacto directo entre aves portadoras y aves susceptibles). La micoplasmosis puede afectar aves silvestres como por ejemplo a los gorriones, palomas, codornices, así como a pavos, gallinas y pollos entre otros, siendo estos últimos los de mayor importancia económica. (6,10,21)

La infección por micoplasma se puede presentar en dos formas: al penetrar ya sea Mycoplasma gallisepticum o Mycoplasma synoviae por vías respiratorias localizándose en tracto superior y sacos aéreos. La colonización ocurre por

medio de una proteína ligante de la membrana del micoplasma uniéndose a una glicoproteína siálica del epitelio traqueobronquial. Una vez colonizado el epitelio se produce una ciliostasis debida a la producción de peróxidos de hidrógeno que inactivan a la enzima epitelial catalasa, permitiendo que el peróxido de hidrógeno actúe sobre la membrana celular, además de la competencia metabólica por la arginina, siendo ésta necesaria para la producción de energía del micoplasma. (5,6) La segunda forma de infección sigue los pasos de la primera pero al llegar a sacos aéreos alcanza la circulación sanguínea y de ahí pasa a serosas de articulaciones y mucosas del aparato reproductor.(18)

La infección por micoplasma estimula el sistema inmunocompetente dando como resultado una respuesta humoral y celular, además de activar al complemento. Sin embargo estos microorganismos poseen la capacidad de cambiar sus epítomos de membrana lo cual facilita su patogenicidad ya que les confiere la capacidad de evadir al sistema inmunocompetente del huésped. Es por ello que la infección por Mycoplasma synoviae y Mycoplasma gallisepticum persiste aún en presencia de anticuerpos. (5,11,17,18)

La infección por micoplasma puede ocasionar un engrosamiento de las membranas sinoviales, exceso de líquido articular y exudado mucopurulento. Además de estas

lesiones, las aves infectadas presentan algunos signos clínicos como: cresta pálida, cojera, mal emplume y retraso en el crecimiento, aumento en la mortalidad, incremento de la conversión alimenticia. Así mismo agrava los problemas respiratorios dando la pauta para la asociación de otras bacterias como E. coli, agrava la incidencia de ascitis y disminuye la producción y calidad tanto interna como externa del huevo, así como su viabilidad, dando como resultado pollitos de mala calidad e incrementa los costos por concepto de medicación. (12,15,18)

Dependiendo de la severidad del problema, en la necropsia pueden observarse cúmulos de ácido úrico en riñones, sacos aéreos opacos y muy irrigados pudiendo presentar exudado caseoso en su interior. (6,15,18).

Microscópicamente puede observarse una respuesta inflamatoria del tracto respiratorio, que incluye una hipertrofia e hiperplasia de las células epiteliales, edema y una masiva infiltración subepitelial de monocitos, linfocitos y heterófilos. Posteriormente se puede observar la formación de nódulos linfoides con centros germinativos e infiltración perivascular linfocítica en las paredes de sacos aéreos. En la forma articular se puede observar una hipertrofia e hiperplasia de las células epiteliales de la membrana sinovial. (5)

Los micoplasmas son sensibles a diversos quimioterapéuticos incluyendo a la tetraciclina, oxitetraciclina, clortetraciclina, lincomicina, tilosina, espectinomina y espiramicina, siendo resistente a las penicilinas. En el caso de Mycoplasma synoviae se ha escrito que a su vez es resistente a la eritromicina. (6,18,21)

Ya que la principal vía de transmisión del micoplasma es transováricamente, y debido a su persistencia, la única manera efectiva de controlarlo es seleccionando parvadas de progenitoras y reproductoras libres del microorganismo. El tratamiento de huevos con tilosina por inmersión o calentando el huevo, se ha utilizado para prevenir la transmisión pero los resultados no han sido los esperados. (6,12,17,18,21)

DIAGNÓSTICO DE LA MICOPLASMOSIS EN MÉXICO

La micoplasmosis en México normalmente se diagnostica con base en la historia clínica y las lesiones encontradas en la necropsia; así mismo se realiza una prueba serológica que es la aglutinación en placa, la cual no es una prueba confiable ya que existe un gran número de factores que pueden alterarla, entre los más importantes tenemos el hecho de que el medio utilizado para el cultivo del micoplasma contiene suero, componente indispensable para el crecimiento de este microorganismo. Se sabe que durante el período de crecimiento los componentes del suero se unen a la membrana del micoplasma y no pueden ser removidos ni aún mediante un lavado, es por esto que cualquier anticuerpo contra los componentes del suero pueden resultar en una reacción falsa positiva, aún con el uso de liposomas artificiales en sustitución del suero necesario para el crecimiento del micoplasma, no se ha logrado eliminar las reacciones falsas positivas, aunque cabe mencionar que sí se han logrado disminuir éstas. (1,8,9,11,12,14,18,22)

Va que muchas de las vacunas emulsionadas en aceite son producidas en medios que contienen sueros, la administración de este tipo de vacunas puede resultar también en reacciones falsas positivas. Además de esto se

sabe que el Mycoplasma synoviae tiene varios antígenos que producen una reacción cruzada con antígenos de Mycoplasma gallisepticum. Esto hace difícil el diagnóstico de la enfermedad. (8,9,11)

Ya que en México no se realiza en forma rutinaria el aislamiento del micoplasma no ha sido posible contar con otras pruebas diagnósticas como la inhibición de la hemaglutinación, inhibición del crecimiento e inmunoperoxidasa, pruebas de identificación de ADN, ELISA, inmunodifusión en agar, entre otras; cabe mencionar que estas técnicas están en desuso debido a la inseguridad de algunas y a lo inconstante de otras, lo que nos obliga a seguir buscando alternativas de diagnóstico para este problema. Es por esto que mientras no se realice el aislamiento en México, el diagnóstico de esta enfermedad seguirá siendo poco confiable, por lo que el aislamiento e identificación se hacen indispensables para optimizar el diagnóstico. Una de las opciones más rápidas, confiables y específicas para la identificación de micoplasmas es la inmunofluorescencia directa, técnica usada en otros países. (2,4,6,7,8,9,11,17,18,19,21,22)

El principio de la técnica de inmunofluorescencia es un procedimiento inmunológico que incluye reacciones antígeno-anticuerpo, los anticuerpos se conjugan químicamente a fluorocromos sin alterar su especificidad

inmunológica. La luz ultravioleta del microscópio de epifluorescencia utilizado para leer las pruebas, excita al fluorocromo emitiendo un color fluorescente. Para la preparación del conjugado deben ser utilizadas únicamente gamaglobulinas separándolas por saturación y precipitación con sulfato de amonio. (3,7,13)

Algunas de las ventajas de este método son: sólo necesita un reactivo de tinción, se requiere un mínimo de testigos para determinar la especificidad, se pueden identificar y diferenciar especies de micoplasmas en colonias mixtas sin necesidad de purificar el cultivo ya que es una prueba específica por especie. (3,7)

En México existen laboratorios de diagnóstico con infraestructura, que con un poco más de interés y apoyo que se le diera al proyecto, podrían realizar por lo menos primocultivos, que sin caer en la complejidad de la metodología para la identificación de Mycoplasma spp. podrían realizar la prueba de inmunofluorescencia con las colonias, para identificar rápidamente si se encuentran presentes Mycoplasma synoviae o M. gallisepticum, que son los patógenos más importantes.

Con el objeto de aislar micoplasmas aviáres, a partir de aves comerciales en México se tomaron muestras de tráqueas y sacos aéreos y se sembraron en el medio de FREY,

a partir del aislamiento obtenido se corrió la prueba de inmunofluorescencia para identificar tanto Mycoplasma synoviae y Mycoplasma gallisepticum.

MATERIAL Y MÉTODOS

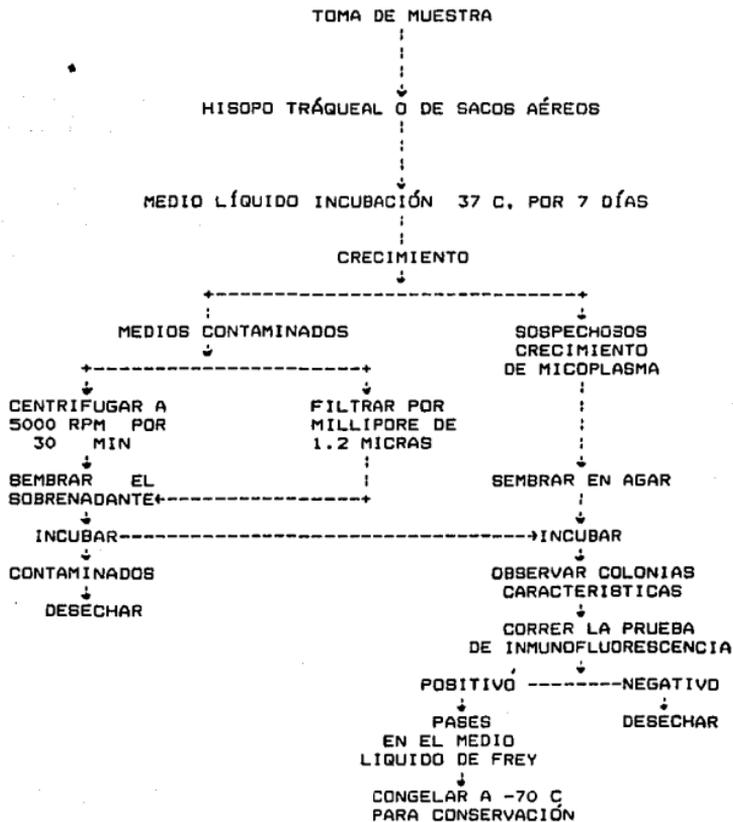
Para el aislamiento se tomaron 10 muestras, 3 de sacos aéreos y 7 de tráqueas de 15 parvadas de aves comerciales de los estados de Morelos, Querétaro y Morelos, identificando cada parvada con números consecutivos del 1 al 15. (cuadro No. 1) Se utilizaron hisopos estériles los cuales se humedecieron previamente en el medio líquido, y se introdujeron a través de la cavidad oral, hasta llegar a la tráquea pasando por ésta 3 o 4 veces. Después del sacrificio por desnucamiento, las muestras de sacos aéreos fueron tomadas de la cara interna de los sacos torácicos tanto craneales como caudales. Los hisopos del 1 al 10 se sembraron posteriormente en el medio líquido de FREY modificado. (6,7)

Con la finalidad de inhibir el crecimiento de contaminantes en el medio, que resultó ser un problema durante el experimento, se decidió sumergir los hisopos de los grupos 11 al 15 en una solución de ampicilina al 0.8% antes de tomar la muestra; además en estos últimos grupos la concentración de la ampicilina en el medio se modificó de la siguiente manera: el grupo 11 se incluyeron en total 2 mg por ml de medio, el 12, 2.5 mg por ml de medio, el 13, 3 mg por ml de medio, el 14, 3.5 mg por ml de medio y el 15, 5 mg por ml de medio, (cuadro No. 1) el procesamiento

posterior de estas muestras fué igual que en los grupos 1 al 10.

Al haber crecimiento sospechoso de ser micoplasma se realizó la identificación tomando una porción del agar en el cual se dejaron secar gotas del medio líquido en la estufa a 37 C, se pusieron en contacto con el conjugado fluorescente tanto para Mycoplasma synoviae (cepa de referencia 1853 WVU) como para M. gallisepticum, (cepa de referencia A5969) [los conjugados fueron donados por la Universidad de Georgia] y se incubó durante 30 minutos a 37 C. Se lavaron con una solución amortiguadora de fosfatos y la prueba se leyó en un microscópio de epifluorescencia (6,17,18,21)

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA EL AISLAMIENTO DE *Mycoplasma* spp.



RESULTADOS

De las 150 muestras tomadas de las 15 diferentes parvadas de las que se obtuvieron las muestras, se logró el aislamiento de una cepa de Mycoplasma synoviae. El crecimiento se obtuvo a los cuatro días de incubación. Las muestras de estos medios pertenecieron al grupo 6, de tráqueas de pollitos de 6 días de edad procedentes del estado de Morelos. Esta cepa se identificó mediante inmunofluorescencia directa. Se realizaron simultáneamente pruebas de testigos tanto positivo como negativo. Algunas de las bacterias que con mayor frecuencia se aislaron de la contaminación en los medios fueron: Proteus spp., Pasteurella spp., Staphylococcus spp. y E. coli, entre las más importantes.

Por otro lado, los medios en los que se aumentó la concentración de antibiótico, se encontró que la concentración mínima inhibitoria del crecimiento de otras bacterias contaminantes fué la usada para el grupo 14 que es de 3.5 mg/ml, de ampicilina (cuadro 2).

DISCUSIÓN

De acuerdo a lo descrito por autores como S. H. Kleven y Yoder (7,21) entre otros, se comprobó que es posible aislar micoplasmas aviáres en el medio descrito anteriormente e identificarlos por medio de la técnica de inmunofluorescencia directa. Probablemente el único aislamiento que se obtuvo fué de Mycoplasma synoviae porque con base en las encuestas serológicas se cree que existe 3 veces más Mycoplasma synoviae que Mycoplasma gallisepticum en el país. Este dato puede ser subjetivo ya que los resultados de las pruebas serológicas no son del todo confiables por lo descrito anteriormente. (1,8,11,18,22)

Independientemente que se haya logrado el aislamiento de una cepa es necesario profundizar en la técnica, ya que con base en la historia de las parvadas se puede pensar que más del 50% de las mismas, se encontraban infectadas con micoplasmas, por lo que se puede considerar el aislamiento como un hallazgo. (14)

El aislamiento del género micoplasma no es una tarea fácil y requiere de extremo cuidado para obtener resultados, ya que existen factores como la quimioterapia, edad de la parvada y la distribución del micoplasma en el organismo, entre los más importantes que pueden interferir con el aislamiento.

A diferencia de lo también descrito por los mismos autores se encontró que la concentración del antibiótico

recomendada para el medio de cultivo (7) resultó insuficiente para inhibir el crecimiento de otras bacterias como E. coli, Proteus spp, Pasteurella spp y Staphylococcus spp. encontrando que la concentración mínima inhibitoria para las bacterias contaminantes en este tipo de medio fué de 3.5 mg por ml de medio líquido. Se piensa que la contaminación del medio se debió a la resistencia de ciertas cepas bacterianas a los antibióticos utilizados en el medio de cultivo.

Alguno de los cambios que sería factible realizar para adaptar la técnica sería incrementar la concentración de los antibióticos usados en el medio, usar otros antibióticos o intentar inhibir el crecimiento de otras bacterias al momento de tomar la muestra como por ejemplo intentar sacrificar a las aves mediante la técnica de embolo gaseoso para tomar las muestras de tráquea y sacos aéreos en condiciones más asepticas, dentro de un laboratorio, evitando tomar las muestras a nivel de campo y directamente de tráquea pasando por la cavidad oral que es una zona altamente contaminada.. Se recomienda intentar el aislamiento a partir de parvadas que presenten una reacción pos-vacunal muy marcada, ya que generalmente no es posible aislar micoplasmas cuando se complica el cuadro con otras bacterias y se presentan lesiones, como por ejemplo el

exudado caseoso que se suelen presentar en la enfermedad crónica respiratoria complicada.

Tomando en cuenta la importancia del problema de la micoplasmosis a nivel mundial y los altos costos que implica el convivir y tratar de eliminar la enfermedad, (18,9), toma gran relevancia el continuar investigando y tratar de adaptar el medio de cultivo a las condiciones de nuestro país, para en un futuro no muy lejano estandarizar la técnica y contar con ella como otra prueba diagnóstica más.

Podemos concluir que no se ha logrado establecer una técnica confiable aún, ya que muy probablemente en las muestras tomadas existían otros micoplasmas más, como Mycoplasma synoviae y Mycoplasma gallisepticum, los cuales por diferentes situaciones no se lograron aislar. Sin embargo podemos partir de este trabajo para futuras aplicaciones de la técnica en México.

CUADRO No. 1.-ORIGEN Y SIEMBRA DE MUESTRAS PARA AISLAMIENTO DE Mycoplasma spp.

GRUPO	PROCEDENCIA	CONCENTRACIÓN DEL ANTIBIÓTICO EN EL MEDIO LÍQUIDO DE FREY
1-4	EDO DE MÉXICO	1 mg/ml
5-6	MORELOS	1 mg/ml
7-10	EDO DE MÉXICO	1 mg/ml
11	QUERÉTARO	2 mg/ml
12	QUERÉTARO	2.5 mg/ml
13	QUERÉTARO	3 mg/ml
14	QUERÉTARO	3.5 mg/ml
15	QUERÉTARO	5 mg/ml

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

19

CUADRO No. 2.-RESULTADOS DE LA INCUBACIÓN DE LAS MUESTRAS

GRUPO	MUESTRAS
	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
1	C C C C C C C C C C C C
2	C C C C C C C C C C C C
3	C C C C C S B C C N S
4	C C C C C C S B C C C
5	C C C C C N C C C S B
6	C C S C C C S C S C
7	C C C C C S B C C C C
8	C C C R C C C C C C
9	C C C C C C C C C C
10	C C C C C C C C C C
11	C C S B C N N N N N
12	C C S S S S C C N N
13	C C C C C C C C C N
14	N N N N N N N N N S
15	N N N N N N N N N N

N=NEGATIVO (NO HUBO CRECIMIENTO)
C=CONTAMINADO (SE PROCESA POR CENTRIFUGACIÓN DE ACUERDO AL DIAGRAMA DE PROCESAMIENTO)
S=SOSPECHOSO (SE TRABAJA DE ACUERDO AL DIAGRAMA DE PROCESAMIENTO)

LITERATURA CITADA

- 1.- Ahmad, Kleven, S. H., Glisson, J. R. and Avakian, A. P.: Further Studies of Mycoplasma gallisepticum Serum Plate Agglutination Antigen Grown In Medium with Artificial Liposomes Substituting for Serum. Avian Dis. 33: 140-149, (1989)
- 2.-Bencina, D. and Bradsbury, J. M.: Indirect Immunoperoxidase Assay for the Detection of Antibody in Chicken Mycoplasma Infections. Avian Pathol. 20:113-124 (1991)
- 3.-Gardella, R. S., DelGiudice, A. R. and Tully, J. G.: Immunofluorescence. In: Methods in Mycoplasmaology. Edited by: Razin, S. and Tully, J. G., 431-438. Academic Press. N.Y., 1983
- 4.-Hyman, C. H., Levison, S., Yogev, D. and Razin, S.: DNA Probes for Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae: Application in Experimentally Infected Chickens. Vet. Microbiol., 20:323-337 (1989)
- 5.-Jordan, F. T. W.: Immunity to Mycoplasmas. In: Avian Immunology. Edited by: British Poultry Sci. South Wirral, England. 313-325, (1981)
- 6.-Kleven, S. H., Rowland, G. N. and Olson, N. O.: Mycoplasma synoviae Infection, In: Diseases of Poultry, 9th ed. Edited by: Calnek, B. W., Barnes, H. J., Beard, C. W., Deid, W. M., and Yoder, H. W. Jr., 223-231, Iowa State University Press. Ames, Iowa, 1991.

- 7.-Kleven, S. H.: Techniques Used in Avian Mycoplasmas. Department of Avian Medicine, University of Georgia. Athens, Georgia (1990)
- 8.-Kleven, S. H. y Soliman A.: Micoplasmosis.: Prueba y Diagnóstico. Industria Avícola. 35(5):(1989)
- 9.-Kleven, S. H.: Mycoplasma Infection in the Poultry Industry: Courrent Concerns. 24th National Meeting on Poultry Health and Condemnations, Ocean City, Maryland. October 19-20, pp. 114-116. 1989
- 10.-Kleven, S. H. and Fletcher, W. O.: Laboratory Infection of House Sparrows (Passer domesticus) with Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae. Avian Diseases. 27(1): 308-311 (1982)
- 11.-Kleven, S. H.: Antibody Response to Avian Mycoplasmas. Am. J. Vet. Res. 36:563-564 (1975)
- 12.-Le Lorier, A. :Enfermedad Respiratoria Crónica Complicada. Memorias de la Primer Jornada Médico Avícola.FMVZ-ANECA, México, 23-27 de Julio:pp. 91-97, 1990.
- 13.-Morilla, G. A., y Bautista, G. C. R.: Inmunofluorecencia. Manual de Inmunología. Diana, México, pp 97-125, (1986)
- 14.-Márquez, M. A.: Encuesta Serológica de la Frecuencia y Distribución Geografica del Mycoplasma gallisepticum y M. synoviae en el Gallus domesticus en México. 1986-1990. Memorias de la 16a. Convención Nacional de la Asociación

- Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México, A. C., Acapulco Gro. 24-27 Abril, 172-175, (1991)
- 15.-Nunoya, T., Tajima, M., Yagihashi, T. and Sannai, S.: Evaluation of Respiratory Lesions in Chickens Induced By Mycoplasma gallisepticum. Jpn. J. Vet. Sci. 49 (4):621-629 (1987)
- 16.-Rodwell A.W. and Whitcomb R. F.: Methods for Direct and Indirect Measurement of Mycoplasma Growth. In: Methods in Mycoplasmaology. Edited by: Razin S. and Tully J. G., 185-196. Academic Press, N.Y., 1983
- 17.-Rosendal, S.: Mycoplasmosis. In: Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. Edited by: Gyles, C. L. and Thoen C. O., 205-215. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1986
- 18.-Septién, J.: Control de la Micoplasmosis. Memorias de la Segunda Jornada Médico Avícola. FMVZ-ANECA, México, 19-23 Agosto. pp 150-160. México (1991)
- 19.-Wallace, A. C.:Growth Inhibition Test. In: Methods in Mycoplasmaology. Edited by: Razin S. and Tully J. G., 405-410. Academic Press, N.Y., 1983
- 20.-Yoder, H. W.: Mycoplasmosis. In:Diseases of Poultry. Edited by: Calnek, B. W., Barnes, H. J., Beard, C. W., Deid, W. M., and Yoder, H. W. Jr., 196-198, Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1991.
- 21.-Yoder, H. W.: Mycoplasma gallisepticum Infection In:Diseases of Poultry. Edited by: Calnek, B. W., Barnes,

H. J., Beard, C. W., Deid, W. M., and Yoder, H. W. Jr.,
198-212, Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1991.

22.-Yoder, H. W.: Production, and Characterization of Avian
Mycoplasmas. Am. J. Vet. Res. 36:560-562 (1975)