

# Método de aislamiento e identificación de *Mycoplasma gallisepticum*

AMADA GONZÁLEZ SOLER

Laboratorio de Bacteriología. Laboratorios de Investigación y Diagnóstico Avícola. "Jesús Menéndez", Santiago de las Vegas. Ciudad de La Habana.

## RESUMEN

En el presente trabajo el autor realizó una revisión bibliográfica de los métodos diagnósticos para aislamiento e identificación de *Mycoplasma gallisepticum*, e hizo énfasis en los principales medios de cultivos utilizados.

## INTRODUCCIÓN

Los Mycoplasmas o PP10 (pleuroneumonia like organism) son organismos cuyo tamaño está comprendido entre las bacterias y los virus, los cuales son responsables de afecciones en las vías aéreas superiores conocidas como Sinusitis Infecciosa en el pavo, y Coriza de Nelson o Mycoplasmosis en los pollos (Renault, 1975).

En los últimos años se han caracterizado aproximadamente 20 serotipos de *Mycoplasma* procedentes de fuentes aviares, algunos de los cuales son significativamente patógenos y han sido agrupados en diferentes aspectos (Yoder, 1974).

Dentro del campo de la avicultura la enfermedad ha sido ampliamente caracterizada causando grandes pérdidas económicas, principalmente al afectar la reproducción de los pollos de ceba (Fahey y col., 1953; Touratier y Camou, 1975).

El curso crónico de la enfermedad le impone la designación de C.R.D. (Chronic Respiratory Diseases), que si bien caracteriza a la Mycoplasmosis Aviar, se debe tener presente que este síndrome es ampliamente observado en otras afecciones.

Por todo lo anterior deseamos señalar que, aunque este trabajo persigue como uno de sus fines destacar las posibilidades profilácticas del diagnóstico serológico de la Mycoplasmosis, así como la importancia del aislamiento del agente causal, son varios los investigadores que coinciden en plantear que el diagnóstico de la Mycoplasmosis debe basarse en la sintomatología clínica y el cuadro lesional como aporte valioso en la lucha contra esta enfermedad (Viamontes, 1970), corroborado por Balencón y Debaste (1975).

No obstante, esperamos que este modesto trabajo sirva para recopilar y ampliar conocimientos acerca del diagnóstico microbiológico y serológico de la Mycoplasmosis Aviar como base para el control de tan peligrosa enfermedad.

### Historia de la enfermedad

La *Mycoplasmosis Aviar* probablemente fue descrita por primera vez por Nelson (1936), citada por Yoder (1974) y como síndrome respiratorio (C.R.D.) por Delaplane y Stuart (1943).

Dentro del género *Mycoplasma* es sin lugar a dudas el *Mycoplasma gallisepticum* la causa primaria de la C.R.D. en aves, aunque otros agentes bacterianos y virales tienden a complicar el síndrome. (Van Reekel y Olesink, 1953); (Fabricant y Levins, 1962) y Yoder (1965) entre otros.

Yoder (1972) plantea que la infección por *Mycoplasma gallisepticum* es actualmente cosmopolita ya que ha sido comprobada su existencia mundialmente.

En nuestro país la enfermedad se encuentra ampliamente distribuida causando numerosos daños económicos en la avicultura nacional (Mouanda, 1978).

### Etiología de la enfermedad

Edward y Kanaret (1960), señalan el *Mycoplasma gallisepticum* como especie patógena dentro del género *Mycoplasma* familia *Micoplasmatacea*, orden *Micoplasmatales*.

Se les define habitualmente como componentes del grupo *Protista-Procarionta* genotípicamente desprovistos de pared. Se comprobó su existencia en el descubrimiento realizado por Nelson en 1936 bajo la denominación de "Cuerpos cocobaciliformes" (Aycardi y Lafont, 1969).

Los *Mycoplasmas* no son ni bacterias ni virus. Ciertos trabajos tienden a considerar a los *Mycoplasmas* bajo el punto de vista filogénico como antecesorés de las bacterias que habrían dado lugar al nacimiento en el curso de la evolución a las bacterias productoras de ácido láctico (*Lactobacillus*, *Streptococcus*) y luego a las bacterias Gram negativas. (Papagorjiou, 1974.)

Según Carter (1969), existen los siguientes tipos de *Mycoplasmas aviáres*:

*Mycoplasma gallisepticum*, asociado a la enfermedad respiratoria crónica, a la *Mycoplasmosis* en los pollitos y la Sinusitis Infecciosa de los pavos, comprende las cepas patógenas A-5969 y 801 del serotipo A.

*Mycoplasma gallinarum* presente en las vías respiratorias, no patógeno.

*Mycoplasma meleagridis*, que produce aerosaculitis del pavo y ha sido aislado del semen, vagina, bolsa de Fabricio, pulmones, tráquea y senos. Pertenece al serotipo H.

*Mycoplasma synoviae*, agente causal de la sinovitis en pollitos y pavos pertenece al grupo serológico S.

### Característica del agente causal

(Butler y Ellaway, 1970), plantean las siguientes características para los microorganismos que pertenecen al género *Mycoplasma*:

Crecimiento en medios artificiales con formación de colonias que se incrustan en el centro de la gelosa.

Son pleomórficos ya que poseen pared rígida.

Miden de 125 a 150 milimicras las formas más pequeñas.

Su metabolismo requiere de esteroides y proteínas en su medio de cultivo, excepto las especies saprófitas.

Todas las especies son resistentes a la penicilina.

Su cultivo se inhibe en presencia de inmunoseros específicos.

Por su parte Razin (1978) expone que los *Mycoplasmas* contienen solamente un mínimo de organelos esenciales para el crecimiento y aplicación celular como son: una membrana plasmática que lo separa del citoplasma, ribosomas para la síntesis de proteínas y una doble cadena de DNA que da la información necesaria para realizar dicha síntesis.

Por otra parte, los trabajos de Yoder (1972) sobre las características del *Mycoplasma gallisepticum* como tal señalan que:

Los organismos se tiñen bien con giemsa, pero son débilmente Gram negativos.

Los organismos miden aproximadamente de 0.25 a 0.5  $\mu$  y son generalmente cocoides.

Mediante microscopía electrónica se ha podido determinar que existe variación en su morfología. Se señaló que al estudiar colonias en crecimiento las células elementales eran hexagonales y se originaban de células más largas, o por fragmentación de filamentos periféricos.

La utilización de las técnicas de cortes en secciones finas ha hecho posible el estudio de su ultraestructura, y así se observaron ribosomas, cuerpos polares densos y se pudo apreciar su forma de reproducción.

#### Principales caracteres diferenciales de los *Mycoplasmas* con respecto a las bacterias

Papageorgiou (1974) plantea como principales caracteres propios de los *Mycoplasmas* los siguientes:

**Ausencia de pared.** Los *Mycoplasmas* están desprovistos de la estructura rígida llamada pared que recubre las bacterias.

La no formación de estas estructuras está ligada a la falta de ácido L E diaminopimélico en su constitución. Estas estructuras limitadas únicamente por una membrana plasmática de tres hojas poco resistente.

Esta deficiencia origina consecuencias importantes.

Los *Mycoplasmas* son muy deformables y ultrafiltrables.

Son muy sensibles a las variaciones de presión osmótica del medio exterior.

Son poliformes.

Son resistentes a los antibióticos inhibidores de la síntesis de la pared, en particular al grupo de la penicilina.

### *Analogías estructurales y caracteres diferenciales con las bacterias.*

Como las bacterias, los *Mycoplasmas* contienen ADN bicatenario liso incluido en el interior de un citoplasma que contiene numerosos ribosomas.

A partir de este hecho se puede considerar a los *Mycoplasmas* como bacterias de un género algo especial. Los especialistas se oponen a esta concepción. Se conocen ciertas bacterias que después de una mutación han perdido una pared celular. Estas son las formas L de las bacterias.

Un estudio atento demuestra, en efecto, las diferencias importantes existentes entre los *Mycoplasmas* y las formas L, la más importante de las cuales radica en la cantidad de ADN, ya que contienen estas últimas mayor masa en daltons que los *Mycoplasmas* por lo que la estructura del ADN es diferente a la de las bacterias.

### *Diagnóstico de la Mycoplasmosis*

#### *Reacciones serológicas*

Biester y Schwarte (1968), señalan que el diagnóstico debe basarse fundamentalmente en un aislamiento del microbio causal, no obstante, son varios los autores que plantean el diagnóstico de la *Mycoplasmosis* basado en la sintomatología clínica y el cuadro lesional como un aporte valioso en la lucha contra esta enfermedad, entre ellos podemos citar a Defore, 1969; Viamontes, 1970, y Balencon y Debaste, 1975.

Cottoreau (1971) considera que para el diagnóstico en los animales adultos se procede de la siguiente manera:

Reacciones serológicas.

Cultivo bacteriológico.

Inoculación al animal.

Por otra parte, Papageorgiou (1974), afirma que el diagnóstico de la *Mycoplasmosis* en el laboratorio puede ser practicado de 3 maneras diferentes:

Seroaglutinación rápida sobre porta.

Inhibición de la hemoaglutinación.

Aislamiento y caracterización de los *Mycoplasmas*.

El simple método de aglutinación rápida sobre porta practicado cada dos meses sobre el 5-10% del efectivo será suficiente a condición de utilizar antígenos estandarizados en relación con un suero patrón.

Según los casos, se emplearán los tres antígenos clásicos de *M. gallisepticum*, *M. synoviae* y *M. meleagridis* que tienen antígenos comunes con *M. gallisepticum*, si bien poseen una parte diferente en su estructura antigénica. Las aves infectadas con *M. gallinarum* no aglutinan habitualmente con los otros antígenos. Los sujetos infectados con *M. synoviae* o *M. meleagridis* pueden reaccionar positivamente con el antígeno de *M. gallisepticum* (Papageorgiou, 1974).

Para practicar la hemoaglutinación conviene utilizar poca sangre (1/10) en relación con la gota de antígeno a utilizar (Balencon y Debaste, 1975).

El siguiente diagrama (Dr. Balencon), ilustra las posibilidades de diagnóstico precoz a partir del momento de la infección de los alimentos.

Tiempo en semanas.

---

0    1    2    3    4    5    6    7    8    9    10

- 0: Momento de la infección de los adultos
- 3: Seroaglutinación - en los adultos
- 3 a 4: Recogida y almacenamiento de los huevos
- 4 a 7: Incubación
- 7: Seroaglutinación - en los pollitos
- 8 - 10: Ovo - aglutinación

El diagrama anterior resume las conclusiones siguientes:

La sero o la hemoaglutinación practicada en los adultos da los resultados más precoces.

La sero o la hemoaglutinación rápida sobre porta practicada en los pollitos, si se opera tan cerca del nacimiento como sea posible — da resultados tan legibles y tan constantes como en los adultos. Estos resultados traducen el estado sanitario de las madres y no el de los pollitos.

La ovoaglutinación es más difícil de interpretar, el método peca por defecto, de tal manera que si comparamos sus resultados con los obtenidos por seroaglutinación sobre pollitos recién nacidos de la misma procedencia, se obtienen las diferencias siguientes:

Los sero-aglutinación sobre pollitos recién nacidos de positivos sobre 1 000 pruebas = 80%.

Lote ovoaglutinación — 74% de positivos sobre 1 000 pruebas.

Este método presenta ciertas ventajas entre las cuales podemos citar la simplicidad de la recogida de muestras y la posibilidad de efectuar controles frecuentes sobre huevos rotos o sucios, no obstante, debe esperarse de 8 a 9 semanas a partir del momento de la infección para ver la positividad del test de ovoaglutinación. Este es el inconveniente mayor para el método. El embrión diagnóstico practicado sobre los huevos picados pero no eclosionados de resultados no específicos de la *Mycoplasmosis*, ya que su etiología es diversa. (Papageorgiou, 1974) citado por (Balencon y Debaste, 1975).

En Cuba Viamontes (1970), plantea el método a seguir para realizar las pruebas serológicas para el diagnóstico de la *Mycoplasmosis*, corroborado con el aislamiento del germen.

Las muestras de sangre se obtienen con numerosas variantes que pasamos a detallar:

1. 3-4 cm de sangre con 0,5 cm de solución de Citrato de sodio al 4%.
2. 4-4,5 cm de sangre sin anticoagulante.
3. Empleo de jeringuillas de 5 y 10 cc.

4. Empleo de agujas, No. 18, 20 y 21.
5. Flebotomía (incisión de la vena cúbito-cutánea).
6. Utilización de tubos de cristal de serología.
7. Esterilización de todo el material a utilizar.
- ~~8. Mantenimiento refrigerado o a temperatura ambiente de las muestras durante 24, 48 y 73 horas después de la extracción.~~
9. Centrifugación o no de las muestras obtenidas con citrato de Na o sin él.

#### *Variante para la realización de las pruebas rápidas*

1. Empleo de placas de cristal cuadrículadas sin relieve o a relieve.
2. Empleo de goteros calibrados para los antígenos y muestras de suero.
3. Empleo del antígeno y las muestras de suero a temperatura ambiente.
4. Utilización o no de solución salina 0,85% para lavar los goteros después de cada muestra.
5. Iluminación correcta del local de lectura.
6. Lectura al minuto, 2 minutos y pasados los 2 minutos. Se darán como positivas aquellas en las que se aprecie una evidente aglutinación.

#### *Respecto a la realización de las pruebas lentas en tubos de aglutinación*

1. Utilización de diluciones del suero: 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160.
2. El pH del antígeno se debe ajustar a 7.
3. El antígeno debe diluirse 1:20 con solución de GIN al 85%.
4. La lectura se efectuará al cabo de 20 horas de mantenerse a 37°C la mezcla de antígeno y suero. La reacción es tanto más positiva cuanto más gruesos y definidos son los grumos de bacterias aglutinadas en el fondo, y a veces en las paredes de los tubos serológicos, y cuanto más transparente queda la columna de líquido. La reacción negativa se caracteriza por un sedimento de bacterias no aglutinadas que forman un botón en el fondo.
5. Los resultados de la sero-aglutinación tanto lenta como rápida coinciden de un 90% a 100%, lo que depende de la calidad y exactitud del trabajo realizado en ambos casos y la experiencia del técnico.

A continuación ofrecemos una tabla donde se muestran los resultados comparativos de las pruebas serológicas lenta y rápida efectuadas simultáneamente 300 aves en un centro con alto positividad de *Mycoplasma*. (Viamontes, 1970). Tabla 1.

Yoder (1974) plantea que la prueba serológica rápida emplea antígenos coloreados específicos para *M. gallisepticum*, *M. meleagridis*, *M. synoviae*, por separado. Aproximadamente 0,02 ml de suero se liga con 0,03 ml de antígeno en una placa de cristal, se rota la placa durante 5 se-

gundos, durante un intervalo de 1-2 minutos y después se leen los resultados. Deben mantenerse tanto el antígeno como las placas y muestras de suero a temperatura ambiente.—

TABLA 1

Tomado de: "Diagnóstico serológico de la *Mycoplasmosis aviar* en Cuba" (Viamontes, 1970) *Revista Avicultura* 14: 106-114

Pruebas	Positivas	Dudosas	Negativas
Sero - Aglutinación rápida	64%	23%	13%
Sero - Aglutinación lenta	66%	21%	13%

Aquellos reactores obvios o las muestras altamente sospechosas son ejemplos que indican reacciones posibles las cuales deben ser confirmadas por el test de inhibición de la hemaglutinación (HI).

Títulos de HI de 1:80 o mayores deben ser considerados como positivos, mientras que títulos de 1:40 son fuertemente sospechosos cuando coinciden en series bien controladas empleando conocidos ejemplos positivos y negativos. Existen criterios de que a menudo es necesario repetir el test 2 ó 3 semanas antes de dar un diagnóstico afirmativo.

En sus trabajos Yoder (1974) plantea también el uso de anticuerpos fluorescentes (FA). Cultivos de algunas colonias típicas de *Mycoplasma* que crecieron en medios bacteriológicos ordinarios para PP10 han podido ser clasificados más rápidamente por anticuerpos en agar, usando para ello antisueros producidos en conejos. (Corstvet, 1964), Isaac y col. (1977) afirman que el propósito principal de la investigación con el uso de FA para la identificación y clasificación de los *Mycoplasmas* es basado en la inhibición del anticuerpo, la precipitación en agar-gel y la fijación del complemento.

### Aislamiento y caracterización de los *Mycoplasmas*

Con relación a los requerimientos para su crecimiento Yoder (1972), señala que el *M. gallisepticum* requiere un medio algo complejo enriquecido en la mayoría de los casos con 10-15% de suero porcino o equino.

Señala este autor que han sido numerosas los medios desarrollados para el aislamiento del *M. gallisepticum*. A continuación presentamos algunos de los más usados:

#### 1. *Mycoplasma Medium* (Frey, 1968)

Caldo base <i>Mycoplasma</i>	22,5 g
Dextrosa	10 g
Suero de puerco o caballo	100-150 ml
Rojo fenol	25 ml
Penicilina potásica G	1000 U/ml
Acetato de talio (1:4000 - 1:2000)*	2,5 - 5,0 ml 10 % solución
Agua destilada	1000 ml

Ajustar pH = 7,7 y esterilizar por filtros.

Esta fórmula originalmente contiene 25 ml de una solución de vitaminas, pero esto no es esencial. El *M. gallisepticum* y el *M. synoviae* fermenta la dextrosa rápidamente, por lo que sólo con 3 g por litro bastan para el proyecto de rutina. El acetato de talio es usado para eliminar los contaminantes semejantes de los órganos investigados.

En general el suero empleado en el medio Mycoplasma es inactivado por calor a 56°C por 30 minutos.

## 2. Caldo PPLO (Lafont, 1977)

Triptona soya o	15 g
PPLO líquido Difco sin cristal violeta	21 g
Glucosa	2,5 g
Agua destilada	450 ml
Esterilizar en tubos 9 ml	
Antes del empleo, agregar a cada tubo:	
Extracto de levadura al 10%	
Esterilizado por filtración - 1 ml	
Suero de caballo o potrico - 1 ml	
Acetato de talio al 1/50 - 0,1 ml	
Penicilina a 2 000 000 UI/ml - 0,1 ml	

La muestra sobre el medio sólido y en medio líquido

## 3. Medio Agar PPLO (Lafont, 1977)

Gelosa PPLO Difco	17 g
Glucosa	59 g
Agua destilada	450 ml
Esterilizar en tubos 15 ml	

Antes del empleo, agitar el tubo y mantenerlo en baño María a 45°C y ajustar estérilmente para una placa de Petry:

Extracto de levadura a 10% esterilizado por filtración - 1,5 ml.

Suero de caballo o potrico - 1,5 ml

Acetato de talio al 1/50 - 0,2 ml

Penicilina a 2 000 000 UI/m

Aplicar alrededor de la placa de Petry escroteg para evitar la desecación. Es recomendable una atmósfera de 5% de C<sub>o</sub>2.

Observar diariamente las placas a la lupa o al microscopio.

Inocular los medios líquidos durante 7 días, desde la aparición de una turbidez; sembrar sobre el medio sólido (0,1-0,2 ml) diseminar.

Según los autores, de no aparecer ninguna turbidez, se debe hacer un nuevo repicaje, los resultados no se deben dar como negativos hasta después de 5-6 repicajes estériles.

## 4. Caldo PPLO (Fedor, 1974)

Agua destilada	— 500 ml
NaCl <sub>2</sub>	— 1,25 g
NaHPO <sub>4</sub>	— 1,9 g
Peptona	— 0,038 g
Extracto levadura	— 5 g
Rojo fenol	— 10 ml de solución 0,5%
Ajustar pH de 7,8-8,0	

Hervir, esterilizar, filtrar y enfriar hasta 50°C y después en forma estéril añadir:

Dextrosa 10%	— 2.5 ml
Suero de caballo	— 50 ml
Acetato de talio	— 0,25 g
Oxacillin	— g

Filtrar de nuevo y luego distribuir en tubos estériles 4 ml.

Se siembran sacos aéreos y tráquea, esperamos 5 días a 37°C hasta detectar el cambio de color.

Tanto en presencia de color positivo (amarillo) como negativo (rojo) se realizan 3 pasajes a medios de cultivos estériles (caldo PPLO) cuyo pH oscila entre 7,6 y 8,0.

Los casos sospechosos se resiembran con Agar PPLO, similar al de la fórmula 3.

*Identificación del agente*

Yoder (1964) plantea que el crecimiento de pequeñas colonias suaves con una elevación densa en el centro sugieren la presencia de *Mycoplasma* especie. Características bioquímicas y culturales de especies de *Mycoplasmas* aviares se presentan en la Tabla 2.

TABLA 2

Resumen de las características diferenciales de los serotipos de *Mycoplasmas* aviares. Tomado de Yoder, H. W. y M. S. Hofstad, 1964. *Avian Dis.* 8: 481

Caracteres	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Tamaño colonias (mm)	0,2	0,7	0,7	0,7	0,8	0,7	0,7	0,2	0,2	0,2	0,6	0,4
Fermentación dextrosa	+	—	+	—	+	+	—	—	+	+	+	—
Hemaglutinación	+	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—
Hemólisis	+	+	+	+	—	+	—	+	—	—	+	+
Reducción de Terazolium	+	+	+	+	—	—	—	—	+	+	+	+
Patogenicidad para el embrión de pollo	+	—	—	J2	J	—	—3	—	+	+	—	—

2—Produjeron abscesos articulares en el aislamiento de cada uno de los serotipos D y E.

3—El aislamiento del serotipo G fue descrito por Moukon y Adler como patógeno para el embrión de pollo.

Con relación a las propiedades bioquímicas del *M. gallisepticum* han sido numerosos los trabajos realizados. Así tenemos los de Yamamoto y Adler (1958 b), Kleckner (1960) y Yoder (1964) que plantean la fermentación por parte de *M. gallisepticum* de la glucosa y la maltosa, con producción de ácido y no de gases. No fermentan la lactosa, dulcitol ni la salicina; la sacarosa es raramente fermentada y los resultados con la galactosa, trehalosa y el manitol son variables.

Yoder y Hofstad (1964), reportaron que el *M. gallisepticum* reduce el 2-3-5 trifenil tetrazolium cloruro que se incorpora al medio como indicador de crecimiento.

### *Suceptibilidad frente a los antibióticos*

*M. gallisepticum* es susceptible al contacto con ciertos antibióticos: Streptomycina, Oxytetracycline, Clorotetracycline, Eritromycina, Magnamycin, Spiramycin y Tylosin (Newnham and Chu, 1965; Yoder *et al*, 1974).

Algunos autores han reportado la resistencia de algunas muestras de *M. gallisepticum* a la Streptomycina, Eritromycina y Spiramycina (Fahey y Crowley, 1953; Yoder, 1974).

Papageorgiou (1974) plantea que el incremento de la resistencia de los Mycoplasmas intracelulares es debido principalmente a los factores siguientes:

Dada la condición de los Mycoplasmas de ser microorganismos que no poseen pared como bacterias, la acción de los antibióticos no se puede ejercer a este nivel.

Ciertas formas defectivas de Mycoplasmas se comportan como virus y no son sensibles a los antibióticos corrientes.

Ciertos antimicoplásmicos son poco difusivos o poco solubles en el citoplasma celular que contienen los micoplasmas.

Ciertos Mycoplasmas se encuentran en estado latente incluidos en vacuola citoplasmática al abrigo de toda intervención terapéutica.

Sin embargo se hace necesario en la lucha contra esta entidad utilizar aquellos antibióticos ante los cuales no se ha detectado una resistencia por parte del *M. gallisepticum* en los métodos de profilaxis de la enfermedad.

### SUMMARY

The author carried out a review of the literature on the diagnostic methods for the isolation and identification of *Mycoplasma gallisepticum*; the leading culture media used are highlighted.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aycardi, J., J. F. Lafont.* (1969). Donnes recents sur l'etiologie et l'epizootiologie de la Mycoplasmosis de poulet. Consequences prophylactiques. Bull. off int. Epiz. 72: 351-380.
- Balencon, M., H. Debaste.* (1975). Diagnostie de la Mycoplasmosis respiratoire de la poule. Valeurs comparees des methods utilisaees sur le tarrain. Les Cahiers de Med. Veterinaire. 44: 91-99.
- Butler, M., W. J. Ellaway.* (1970). Growth and cytopathogenicity of *Mycoplasma* in human and chickens trachea explants. Dep. of Biol. Sci. Univ. of Surrey Amer. Socie. for Microbiology 12: 190-195.
- Carter, G. R.* (1969). Procedimientos de diagnóstico en bacteriología y micología veterinarias. Editorial Acribia. Zaragoza. P. 160-161.
- Corstvet, R. E., W. W. Sadter.* (1964). Le diagnosis of certain avian diseases with fluorescent, antibody technique. Poultry Sc. 43: 1280-1288.
- Defore, E.* (1969). La maladie respiratoire chronique stiolgie, it pathogema. Conference prononcés a la Foire de L'Europe de L'Oest. Tours. Franca. Le Courier,
- Edward, D. G., A. D. Kanarađ.* (1960). Organims of the PPLO groups of avian origen; Their clasification into species. Ann. N. Y. Acaded. Sc. 79: 696-702.
- Fabricant, J., P. P. Levine.* (1962). Experimental production of complicated C.D.R. infection (air sac diseases). Avian Diseases 6: 13-23.
- Fabey, J. E., J. F. Crowley.* (1963). Studies on chronic respiratory disease of chickens. J. Comp. Med. Vet. Sc. 18: 13-21.
- Fedor, D.* (1974). Centro de Investigaciones y Diagnóstico Aviar. "Lab. Jesús Menéndez." Comunicación Personal.
- Frey, M. L., R. P. Hanson; D. P. Anderson.* (1968). A medium for the isolation on avian mycoplasmas. Am. J. Vet. Res. 29: 2163-2171.
- Gross, W. B.* (1956). E. coli as a complicating factor in C.R.D. of chickens and infection sinusitis of turkeys. Poul. Sci. 765-771.
- Isac, N., H. W. Yoder.* (1977). Identification of Avian *Mycoplasma* iso lated by the Agar - gel precipiting test. Avian Diseases 21: 370-371.
- Kleckener, A. L.* (1960). Serotypes of Avian *Mycoplasma*. Am. J. Vet. Rev. 21: 370-371.
- Lafont, J. P.* (1977). Centro de Investigaciones y Diagnóstico Aviar. "Lab. Jesús Menéndez." Comunicación Personal.
- Mounda, B.* (1978). Aspectos en el diagnóstico de la Mycoplasmosis en Cuba. Trabajo de Diploma para el grado de Dr. en Medicina Veterinaria ISCAH.
- Newham, A. G., H. P. Chum.* (1965). Comparación "in vitro" de algunos agentes antibacterianos, antifungicos y antiprotozoales sobre varias cepas de *Mycoplasma*. J. Hyg. 63: 123.
- Olesink, O., H. Van Rockel.* (1953). The etiology of respiratory diseases. Proc. 90 th, Ann. Meet. Am. Vet. Med. Ass. P. 289-303.
- Papageorgiou, C.* (1974). Aspectos generales sobre la Mycoplasmosis Aviar. X Simposio Cientifico y X Asamblea General Animal. Poul. Sci. Org. P. 202-242.
- Razin, Sh.* (1978). The Mycoplasmas microbiological Reviews. 42 (2) 414-470.

- Renaude, L.** (1975). Les maladies de l'appareil respiratoire les volailles. Laboratorio Sanders (Separata).
- J. P., H. D. Stuart** (1943): The propagation of a virus in embryonate chickens eggs causing a C.R.D. of chickens. *Am. J. Vet. Res.* 4: 325-332.
- Viamontes, O.** (1970). Diagnóstico serológico de la Mycoplasmosis Aviar en Cuba. *Revista Avicultura* 14: 106-114.
- Yanamoto, R., H. E. Adler.** (1958b). Characterization of PPLO of Avian origin. Cultural biochemical, morphological and further serological studies. *J. Infect. Diseases.* 102: 243-250.
- Yoder, H. W., M. S. Hofstad.** (1964). Characterization of Aviar Mycoplasma. *Avian Diseases* 8: 481.
- Yoder, H. W.** (1965). Infections Coryza and Avian Mycoplasmosis. In *Diseases of Poultry* (Biester and Schwarts eds) 5th. ed. State Univ. Press. Ames., Iowa, p. 405-426.
- Yoder, H. W.** (1972). *Mycoplasma gallisepticum*, infection. In *Diseases of Poultry* 6th Edition (M. S. Hofstad, B. W. Calnek, C. F. Helmoldt; W. M. Reid; H. W. Yoder, Jr.; eds). Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa, p. 282-307.
- Yoder, H. W.** (1976). Avian Mycoplasmosis (Separata) Southeast Poultry Research Laboratory.