

Primer aislamiento e identificación de *Ureaplasma* spp y de *Mycoplasma lipofaciens* de gallinas comerciales en México

First isolation and identification of *Ureaplasma* spp and *Mycoplasma lipofaciens* in commercial hens in Mexico

Ernesto Soto Priante^a, Clemente Lemus Flores^b, Ariel Ortiz Muñiz^c

RESUMEN

Durante un estudio realizado en México durante los años 2003 y 2004 se realizó el aislamiento de *Ureaplasma* spp (*U. spp*) y de *Mycoplasma lipofaciens* (*M. lipofaciens*) de la porción superior de la tráquea de aves comerciales vivas y sanas tipo White Leghorn (*Gallus gallus domesticus*). Se identificaron un total de 13 aislamientos de *U. spp* y 8 aislamientos de *M. lipofaciens* entre los 223 micoplasmas aislados. El aislamiento de *U. spp* se realizó en una sola granja avícola localizada en el estado de Jalisco en aves de 50 semanas de edad. El aislamiento de *M. lipofaciens* se realizó en granjas avícolas localizadas en el mismo estado de Jalisco así como en el estado de Puebla, en aves de 50 a 80 semanas de edad. Este es el primer informe del aislamiento e identificación de *U. spp* y de *M. lipofaciens* en México, lo que puede considerarse relevante si se toma en cuenta que los ureaplasmas pueden ser de origen aviar o humano, y por ello será necesario determinar su posible transmisión entre especies. Además *M. lipofaciens* reacciona positivamente cuando se realizan pruebas serológicas hacia *M. synoviae*, lo que puede generar errores en diagnóstico y tratamientos innecesarios.

PALABRAS CLAVE: *Ureaplasma* spp, *Mycoplasma lipofaciens*, *Gallus gallus domesticus*, Tráquea.

ABSTRACT

During a study carried out in Mexico in 2003 and 2004, both *Ureaplasma* spp and *Mycoplasma lipofaciens* were isolated from the upper trachea of live, healthy commercial White Leghorn (*Gallus gallus domesticus*) birds. In total 13 *U. spp* and 8 *M. lipofaciens* isolates were identified among the 223 mycoplasmas isolated. *U. spp* was isolated from one single farm located in the state of Jalisco, housing 50-wk-old hens. *M. lipofaciens* was isolated from several farms in the States of Jalisco and Puebla, including 50-80 wk-old birds. This is the first report about the isolation and identification of both *U. spp* and *M. lipofaciens* in Mexico. This can be considered relevant since ureaplasmas can be of avian or human origin, so that determining the potential interspecies transmission is required. In addition, *M. lipofaciens* yields positive reactions when serological tests for *M. synoviae* are performed, which can result in diagnostic errors and unnecessary treatments.

KEY WORDS: *Ureaplasma* spp, *Mycoplasma lipofaciens*, *Gallus gallus domesticus*, Trachea.

Los micoplasmas son eubacterias aerobias facultativas que contienen ADN, carecen de pared celular y requieren colesterol para su crecimiento *in vitro*. Estos microorganismos se encuentran clasificados dentro de la clase Mollicutes (*mollis, suave; cutis, piel*); orden Mycoplasmatales; familia I Mycoplasmatacea. Los ureaplasmas pertenecen al

The mycoplasma are facultative aerobic eubacteria that contain DNA, they lack of cellular wall and they require sterols for their growth *in vitro*. These microorganisms belong to the class Mollicutes (*mollis, soft; cutis, skin*); order Mycoplasmatales; family I Mycoplasmatacea. The ureaplasmas belongs to the genus II: *Ureaplasma*, and they are

Recibido el 6 de febrero de 2008. Aceptado el 4 de septiembre de 2009.

^a Laboratorio Avimex SA de CV. Bartolache 1862, CP 03100, México, DF. Teléfono: (55) 5445 0460. soto@avimex.com.mx. Correspondencia al primer autor.

^b Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Nayarit.

^c Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México.

género II: *Ureaplasma* y se caracterizan por su habilidad de hidrolizar la urea (única entre todos los géneros de la familia Mycoplasmatacea)⁽¹⁾.

Los ureaplasmas son microorganismos conocidos por infectar humanos y otros mamíferos (incluyendo ganado vacuno, perros, gatos, monos, ovinos, caprinos, minks, mapaches y porcinos), y aves (incluyendo codornices, gallinas domésticas y pavos)^(2,3). Los ureaplasmas aviáres (también conocidos como micoplasmas-T por sus siglas en inglés tiny – pequeño) se han encontrado en 1977 en Hungría⁽⁴⁾ y en 1978 en Japón (*Ureaplasma gallorale*)⁽⁵⁾. Se ha informado de la presencia de ureaplasmas aviáres en gallinas comerciales sanas^(6,7) y también en pavos con problemas de fertilidad^(8,9). Se han podido aislar ureaplasmas aviáres después de la inoculación experimental intra-traqueal. Los sitios de donde se recuperaron fueron la conjuntiva, orofaringe, cavidad nasal y tráquea superior e inferior. Los ureaplasmas aviáres parecen ser no patógenos, pero pueden estar asociados con lesiones y signos clínicos que incluyen neumonía, aerosaculitis y peritonitis en pollos y pavos^(2,4,9).

Mycoplasma lipofaciens pertenece al género I: *Mycoplasma* y se caracterizan por su habilidad para fermentar la glucosa e hidrolizar la arginina. Carecen de actividad de la fosfatasa y de capacidad para hidrolizar la urea^(10,11). El *M. lipofaciens* es un microorganismo que ha sido aislado únicamente de gallinas domésticas. Se aisló por primera vez de los senos infraorbitales de una gallina adulta clínicamente sana en Inglaterra en 1975⁽¹²⁾; pero no fue hasta 1983 que el aislamiento R171^T denominado cepa tipo fue completamente investigada y elevada al rango de especie⁽¹³⁾. El aislamiento R171^T (NCTC 10191 y ATCC 35015) es bioquímicamente similar a *Mycoplasma iowae* (aislado únicamente de pavos), ya que tienen la habilidad inusual de utilizar tanto la glucosa como la arginina, rasgo único entre especies de micoplasmas aviáres. Esta propiedad se comparte con micoplasmas que infectan a otras especies animales como son *M. alvi*, *M. capricolum*, *M. fermentans*, *M. noatsii* y *M. sualvi*⁽¹³⁾. No se conoce su patogenicidad⁽⁴⁾, pero la infección experimental con el aislamiento R171^T ha causado mortalidad en embriones de pollo y pavos, así como resultados

characterized by their ability to hydrolyze the urea (unique among all the genus of the family Mycoplasmatacea)⁽¹⁾.

The ureaplasmas are microorganisms known for infecting human and other mammals (including bovine livestock, dogs, cats, monkeys, ovine, goat, minks, raccoons and porcine), and poultry (including quails, domestic hens and turkeys)^(2,3). The avian ureaplasmas (also known as T-mycoplasmas) were found in 1977 in Hungary⁽⁴⁾ and in 1978 in Japan (*Ureaplasma gallorale*)⁽⁵⁾. It was informed of the presence of avian ureaplasmas in healthy commercial chickens^(6,7) and also in turkeys with fertility problems^(8,9). It was possible to re-isolate avian ureaplasmas after the experimental intra-tracheal inoculation. It was recovered from the conjunctive, oropharynx, nasal cavity and upper and lower trachea. The avian ureaplasmas seems to be non pathogenic, but they can be associated with lesions and clinical signs that include pneumonia, airsacculitis and peritonitis in chickens and turkeys^(2,4,9).

Mycoplasma lipofaciens belongs to the genus I: *Mycoplasma* and they are characterized by their ability to ferment the glucose and hydrolyze the arginine. They lack of phosphatase activity and capacity to hydrolyze the urea^(10,11). *M. lipofaciens* is a microorganism that was only isolated of domestic hens. It was isolated for the first time from the infraorbital cavity of a clinically healthy mature hen in England in 1975⁽¹²⁾; but it was until 1983 that the isolation R171^T called strain type was totally researched and changed to the range of species⁽¹³⁾. The isolation R171^T (NCTC 10191 and ATCC 35015) is biochemically similar to *Mycoplasma iowae* (only isolated from turkeys), since they have the unusual ability to use as much the glucose as the arginine, unique characteristic among species of avian mycoplasmas. This characteristic is shared with mycoplasmas that infect other animal species as *M. alvi*, *M. capricolum*, *M. fermentans*, *M. noatsii* and *M. sualvi*⁽¹³⁾. Their pathogenicity is not known⁽⁴⁾, but the experimental infection with the isolation R171^T caused mortality in chicken and turkey embryos, as well as positive results on blood test (crossed reaction in a single sense) using the antigen of *M. synoviae*^(13,14). At

serológicos positivos (reacción cruzada en un solo sentido) utilizando el antígeno de *M. synoviae*^(13,14). A nivel mundial solamente se ha reportado la presencia de *M. lipofaciens* en Inglaterra y Estados Unidos de Norteamérica^(10,12,15).

El objetivo de este estudio realizado en México fue el aislamiento e identificación de especies de micoplasmas presentes en la avicultura comercial y que no hubieran sido reportadas.

Con el fin de incluir especies de micoplasmas no patógenas, el estudio fue llevado a cabo en gallinas de postura comerciales clínicamente sanas (sin evidencia de signos clínicos y con una producción de huevo dentro de los parámetros de la estirpe). Las edades de las parvadas estudiadas se encontraban entre las 20 y 80 semanas de edad, y se encontraban alojadas en los dos estados de México con mayor producción de huevo (Jalisco y Puebla). Solamente se seleccionaron para el estudio parvadas con más de 200,000 aves cada una (Cuadro 1) y sin historial de uso de antibióticos con el fin de evitar que estos inhibieran el crecimiento de los micoplasmas.

Se recolectaron un total de 600 muestras, 50 en cada una de las seis parvadas en cada uno de los

world level the presence of *M. lipofaciens* was only reported in England and United States^(10,12,15).

The objective of this study carried out in Mexico was the isolation and identification of species of mycoplasmas that exist in the commercial poultry, and that have not been reported.

With the purpose of including species of non pathogen mycoplasmas, the study was carried out with clinically health commercial chickens (without evidence of clinical signs and with an egg production within parameters). The ages of flocks ranged from 20 to 80 wk, and the flocks were located in the two States of Mexico with more egg production (Jalisco and Puebla). For the study were only selected flocks with more than 200,000 birds each one (Table 1) and without record of use of antibiotics with the purpose of avoiding that these inhibited the growth of the mycoplasmas.

There were gathered a total of 600 samples, 50 in each one of the six flocks in each one of the two States that were included in the study. Sterile cotton swabs were used with a diameter of 3 mm to take samples of the upper part of the trachea⁽¹⁶⁾. They

Cuadro 1. Localización geográfica, edad y tamaño de las parvadas de gallinas comerciales de donde fueron obtenidas las muestras para el aislamiento primario de micoplasmas

Table 1. Geographical localization, age and size of the flocks of commercial hens where the samples were obtained for the primary isolation of mycoplasmas

Samples sizes	Birds per flock	Age (weeks)	State
1-50	225,000	60	Puebla
51-100	275,000	50	Puebla
101-150	245,000	40	Puebla
151-200	215,000	30	Puebla
201-250	285,000	50	Puebla
251-300	240,000	70	Puebla
301-350	280,000	60	Jalisco
351-400	255,000	30	Jalisco
401-450	215,000	80	Jalisco
451-500	235,000	20	Jalisco
501-550	260,000	40	Jalisco
551-600	275,000	50	Jalisco

dos estados que fueron incluidos en el estudio. Se utilizaron hisopos de algodón estériles con un diámetro de 3 mm para tomar muestras de la parte superior de la tráquea⁽¹⁶⁾. Se agitaron los hisopos dentro de tubos de cristal de 5 ml conteniendo medio de cultivo líquido de Frey con acetato de talio (2 g/L) y penicilina (2 millones de U/L)⁽¹⁷⁾. Posteriormente se retiraron los hisopos y los tubos conteniendo el medio inoculado se refrigeraron entre 2 y 7 °C, y se les transportó durante la noche al laboratorio (menos de 24 h) donde se les incubó a 37 °C durante 8 días. Posteriormente se inocularon en placas de agar conteniendo medio sólido de Frey (cajas de Petri de 50 mm), las cuales se incubaron dentro de un frasco a 37 °C por 30 días con la adición de una gasa estéril humedecida para mantener una alta humedad relativa⁽¹⁸⁾.

Los cultivos se observaron diariamente para la detección de colonias de micoplasmas utilizando un microscopio estereoscópico con un aumento de 40X. Cuando se detectaron colonias, las observaciones se complementaron con un microscopio óptico con un aumento de 100X. Se clonaron las colonias biológicamente tres veces así: se inoculó un pequeño cuadro de agar conteniendo una sola colonia en medio líquido de Frey y se incubó a 37 °C. Se almacenaron a -70 °C con 10% de glicerol a las colonias sospechosas que crecieron en el medio líquido de Frey. Se analizaron por triplicado las colonias para determinar sus patrones de reacciones bioquímicas^(11,19). Para ello se emplearon 5 ml de medio de cultivo y 1 ml de inóculo para cada cultivo. Las pruebas incluyeron fermentación de la glucosa (glucosa al 1% con un pH ajustado a 8.0); hidrólisis de arginina (arginina al 0.2% con un pH ajustado a 7.0); actividad de la fosfatasa (cultivos en placas de Petri con fenoltaleína difosfato al 1%); e hidrólisis de la urea (urea al 1% con un pH ajustado a 7.0). La positividad o negatividad a las pruebas mencionadas se ajustó a lo recomendado por Goll⁽¹¹⁾ y Bradbury⁽¹⁹⁾. Como testigo positivo se incluyeron dos especies de micoplasma: *Mycoplasma synoviae* cepa WVU 1853 y *Mycoplasma gallisepticum* cepa A5969. Como testigo negativo se utilizaron tubos conteniendo medio de Frey sin micoplasmas.

were agitated inside glass tubes of 5 ml containing liquid Frey culture medium with thallium acetate (2 g/L) and penicillin (2 millions of U/L)⁽¹⁷⁾. Then the cotton swabs were discarded and the tubes containing the inoculated medium were refrigerated between 2 and 7 °C, and they were night transported to the laboratory (less than 24 h) where they were incubated at 37 °C for 8 d. Later, agar plates containing Frey solid medium (Petri boxes of 50 mm) were inoculated, and then incubated inside a flask at 37 °C for 30 d with the addition of a humidified sterile gauze to maintain a high relative humidity⁽¹⁸⁾.

The cultures were observed daily for the detection of mycoplasma colonies using a stereo microscope with a zoom of 40X. When colonies were detected, the observations were supplemented with an optic microscope with a zoom of 100X. The colonies were cloned biologically three times in this way: a small agar square containing a single colony was inoculated on Frey liquid medium and then incubated at 37 °C. They were stored at -70 °C with 10% of glycerol to the suspicious colonies that grew in the Frey liquid medium. The colonies were analyzed three times to determine their patterns of biochemical reactions^(11,19). In this case there were used 5 ml of culture medium and 1 ml of inoculum for each culture. The tests included glucose fermentation (glucose at 1% with a pH set at 8.0); arginine hydrolysis (arginine at 0.2% with a pH set at 7.0); phosphatase activity (cultures in Petri plates with diphosphate phenolphthalein at 1%); and urea hydrolysis (urea at 1% with a pH set at 7.0). The positive or negative reaction to the mentioned tests were adjusted to that recommended by Goll⁽¹¹⁾ and Bradbury⁽¹⁹⁾. As positive control two mycoplasma species were included: *Mycoplasma synoviae* strain WVU 1853 and *Mycoplasma gallisepticum* strain A5969. As negative control tubes were used containing Frey medium without mycoplasmas.

A total of 223 isolations of hens were obtained, same that showed the morphology characteristic in solid medium of “fried egg” of the family Mycoplasmatacea. The result of the biochemical tests revealed that 133 isolations showed a negative

En el estudio realizado se obtuvieron un total de 223 aislamientos de gallinas, mismos que en medio sólido mostraron la característica morfología de “huevo estrellado” de la familia Mycoplasmatacea. El resultado de las pruebas bioquímicas reveló que 133 aislamientos presentaron una fermentación negativa a la glucosa, de las cuales 13 muestras produjeron una reacción positiva en la prueba de hidrólisis de la urea y se les identificó como *Ureaplasma* spp⁽¹¹⁾. Los 13 aislamientos fueron también positivos a la hidrólisis de arginina (en medio de cultivo líquido sin la adición de urea) y negativos a la actividad de la fosfatasa (Cuadro 2). Solamente en una granja en Jalisco se identificó un *U. spp* en aves de 50 semanas de edad. Esto representa el 2.16 % de todas las muestras (13 aislamientos de 600 muestras) provenientes de 12 parvadas en los dos principales estados productores de huevo de México.

Se obtuvieron 91 aislamientos que presentaron una fermentación positiva a la glucosa, de los cuales ocho produjeron una reacción positiva en la prueba de hidrólisis de arginina, pero tuvieron una reacción negativa a la actividad de la fosfatasa y a la

fermentación to the glucose, of which 13 samples produced a positive reaction in the test of urea hydrolysis and they were identified as *Ureaplasma* spp⁽¹¹⁾. The 13 isolates were also positive to arginine hydrolysis (in liquid culture without the addition of urea) and negative to the phosphatase activity (Table 2). *U. spp* was identified only in one farm in Jalisco in birds of 50 wk of age. This represents 2.16 % of all the samples (13 isolates of 600 samples) coming from 12 flocks in the two main States of Mexico that produce egg.

Ninety one (91) obtained isolates showed a positive glucose fermentation, of which eight produced a positive reaction in the test of arginine hydrolysis, but they had a negative reaction to the phosphatase activity and the urea hydrolysis (Table 3). The final identification of the species of these isolations as *M. lipofaciens* was achieved by the growth inhibition test in solid medium⁽¹¹⁾ using a panel of monospecific antisera obtained from the University of California in 1995. Each disk of filter paper of 6 mm was impregnated with 0.025 ml of antisera. The used inoculum was adjusted to a title of 10⁴ UFC/ml.

Cuadro 2. Reacciones bioquímicas obtenidas en los 132 cultivos probados para ureaplasmas

Table 2. Biochemical reactions obtained in 132 ureaplasms tested cultures

State	Age (weeks)	No of cultures	Glucose fermentation	Arginine hydrolysis	Phosphatase activity	Urea hydrolysis
Puebla	40	8	Negative	Positive	Negative	Negative
	50	24	Negative	Positive	Negative	Negative
	60	4	Negative	Positive	Negative	Negative
	70	13	Negative	Positive	Negative	Negative
Jalisco	20	3	Negative	Positive	Negative	Negative
	30	6	Negative	Positive	Negative	Negative
	40	12	Negative	Positive	Negative	Negative
	50	13	Negative	Positive	Negative	Positive
		11	Negative	Positive	Negative	Negative
	60	18	Negative	Positive	Negative	Negative
	80	20	Negative	Positive	Negative	Negative
MG		1	Positive	Negative	Negative	Negative
MS		1	Positive	Negative	Negative	Negative

MG= positive control. *M. gallisepticum*, strain A5969.

MS= positive control. *M. synoviae*, strain WVU1853.

hidrólisis de la urea (Cuadro 3). La identificación final de la especie de estos aislamientos como *M. lipofaciens* se logró mediante la prueba de inhibición del crecimiento en medio sólido⁽¹¹⁾ utilizando un panel de antisueros monoespecíficos obtenidos de la Universidad de California en 1995. Cada disco de papel filtro de 6 mm fue impregnado con 0.025 ml de antisuero. El inóculo utilizado se ajustó a un título de 10⁴ UFC/ml. El resultado positivo fue dado cuando a través del microscopio estereoscópico se observó una distancia mínima de 5 mm entre el borde del disco y el inicio del crecimiento bacteriano.

Cuatro muestras positivas se obtuvieron de Puebla en aves de parvadas de 50, 60 y 70 semanas de edad, y cuatro muestras fueron obtenidas de Jalisco en una sola parvada de 80 semanas de edad. Esto significa el 1.33 % de todas las muestras.

Los materiales y métodos sugeridos para la toma de muestras por Zain y Bradbury⁽¹⁶⁾ fueron muy útiles dado que la tasa normal de aislamiento es de 1 por cada 5 muestras⁽¹⁸⁾ y en este trabajo se obtuvo 1 aislamiento por cada 2.65 muestras. Así mismo los medios de cultivo y el manejo de las muestras sugeridos por Gentry⁽¹⁷⁾ y Kleven⁽¹⁸⁾ y Whitford⁽¹⁹⁾ fueron extremadamente útiles para el aislamiento y conservación de micoplasmas aviarios.

La metodología para realizar las pruebas bioquímicas y la prueba de inhibición del crecimiento sugerida

The positive result was given when through the stereo microscope a minimum distance of 5 mm was observed between the border of the disk and the beginning of the bacterial growth.

Four positive samples were obtained of the State of Puebla in birds of flocks of 50, 60 and 70 wk of age, and four samples were obtained of State of Jalisco in a single flock of 80 wk of age. This means 1.33 % of all the samples.

The materials and methods suggested for taking of samples by Zain and Bradbury⁽¹⁶⁾ were very useful since the normal rate of isolation is of 1 for each 5 samples⁽¹⁸⁾ and in this work 1 isolation was obtained by each 2.65 samples. Likewise the culture medium and the handling of the samples suggested by Gentry⁽¹⁷⁾, Kleven⁽¹⁸⁾ and Whitford⁽¹⁹⁾ were extremely useful for the isolation and conservation of avian mycoplasmas.

The methodology to carry out the biochemical tests and the growth inhibition test that suggests Goll⁽²⁾, Kleven⁽¹⁰⁾ and Bradbury⁽¹⁵⁾ were very practical and efficient in the identification of the species of *M. lipofaciens* and *U. spp.* The isolations of *Ureaplasma spp* obtained of commercial hens in Mexico showed a biochemical behavior different to the one mentioned by Koshimitzu and Magaribuchi in Japan in 1978 with the strain type denominated D6-1 (*U. gallorale*), which were

Cuadro 3. Reacciones bioquímicas obtenidas en los 91 cultivos de micoplasmas que resultaron positivos a la glucosa
Table 3. Biochemical reactions obtained in 91 mycoplasmas cultures that were positive to the glucose test

State	Age (weeks)	Glucose fermentation	Arginine hydrolysis	Phosphatase activity	Urea hydrolysis
Puebla	40	13	0	0	0
	50	36	2	0	0
	60	15	1	0	0
	70	19	1	0	0
Jalisco	80	8	4	0	0
MG		Positive	Negative	Negative	Negative
MS		Positive	Negative	Negative	Negative

MG= positive control. *M. gallisepticum*, strain A5969.

MS= positive control. *M. synoviae*, strain WVU1853.

por Goll⁽²⁾, Kleven⁽¹⁰⁾ y Bradbury⁽¹⁵⁾ resultó muy práctica y eficiente en la identificación de las especies de *M. lipofaciens* y de *U. spp*. Los aislamientos de *Ureaplasma* spp obtenidos de gallinas comerciales en México presentaron un comportamiento bioquímico diferente a lo mencionado por Koshimitzu y Magaribuchi en Japón en 1978 con la cepa tipo denominada D6-1 (*U. gallorale*), los cuales resultaron negativos a la hidrólisis de arginina en pruebas realizadas sin la adición de urea⁽²⁾. Nuestros resultados también difieren de las observaciones reportadas por Koshimitzu y Magaribuchi en Japón en 1978 con respecto a la tasa de aislamiento, donde los ureaplasmas fueron aislados en el 22.8 % (111 aislamientos de 486 aves, representando 31 parvadas localizadas en 9 prefecturas)⁽²⁾.

Por lo que respecta a *M. lipofaciens*, los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con los obtenidos por otros investigadores^(12,13), quienes aislaron *M. lipofaciens* de gallinas comerciales en muy baja proporción de acuerdo con el número de muestras tomadas y aislamientos logrados.

Tras una revisión detallada de la literatura formal, es posible concluir que este estudio es el primero en identificar *Ureaplasma* spp y *Mycoplasma lipofaciens* en gallinas comerciales de México. Dado que en México y en la mayor parte del mundo con avicultura industrializada se utilizan básicamente las pruebas serológicas para la detección de los dos principales micoplasmas patógenos para las gallinas como son *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae*, el aislamiento e identificación de *U. spp* y *M. lipofaciens* (para los cuales no existen antígenos comerciales para pruebas serológicas) resulta una contribución al entendimiento del papel que juegan micoplasmas y especies relacionadas como el ureaplasma en la fisiopatología de problemas respiratorios y reproductivos infecciosos de las aves. Por tanto, es factible ponderar que sería de utilidad epizootiológica realizar el aislamiento e identificación de especies de micoplasmas infectantes de las aves previo al sacrificio de parvadas serológicamente positivas o antes del inicio de un tratamiento antimicoplásmico. Esto permitiría evaluar si los microorganismos aislados tienen o no participación en el desarrollo

negativo to the arginine hydrolysis in tests carried out without the addition of urea⁽²⁾. Our results also differ from the observations that Koshimitzu and Magaribuchi reported in Japan in 1978 with regard to the isolation rate, where the ureaplasmas were isolated in 22.8 % (111 isolations of 486 birds, representing 31 flocks located in nine sites)⁽²⁾.

Regarding *M. lipofaciens*, the results obtained in this study match with those of other researchers^(12,13), whom isolated *M. lipofaciens* of commercial hens in very low proportion with the number of samples taken and isolations achieved.

After a detailed revision of the formal literature, it is possible to conclude that this study is the first one in identifying *Ureaplasma* spp and *Mycoplasma lipofaciens* in commercial hens of Mexico. Since in Mexico and in most of the world with industrialized aviculture, the blood tests are used for the detection of the two main pathogen mycoplasmas for hens as *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*, the isolation and identification of *U. spp* and *M. lipofaciens* (for which commercial antigens does not exist for blood tests) it is a contribution to the understanding of the role that mycoplasmas and related species play such as the ureaplasma in the physiopathology of respiratory and reproductive infectious problems of poultry. Therefore, it is of epizootiological interest to carry out the isolation and identification of species of mycoplasmas that infect poultry before to the sacrifice of flocks that were positive on blood tests or before starting an antimycoplasmic treatment. In this way would be evaluated if the isolated microorganisms have or no participation in the development of clinical signs, macroscopic injuries or a deficient egg production, as well as effects in the embryos. This despite at first sight, the infected flocks did not show evidence of clinical signs, macroscopic lesions or problems on egg production that could be associated to the infection with mycoplasmas. Actually it is few what is known about the pathogenic potential of both microorganisms as primary or secondary agents of the respiratory and reproductive systems of the hens, but it is necessary to define that potential.

de signos clínicos, lesiones macroscópicas o una producción subóptima de huevo, así como efectos en los embriones. Esto a pesar de que en apariencia primaria, las parvadas infectadas no presentaron evidencia de signos clínicos, lesiones macroscópicas o problemas de producción de huevo que pudieran ser asociadas a la infección con micoplasmas. En la actualidad es poco lo que se sabe del potencial patogénico de ambos microorganismos como agentes primarios o secundarios del árbol respiratorio y del aparato reproductivo de las gallinas, pero es necesario definir el potencial referido.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a Diagnósticos Clínicos Veterinarios SA de CV por permitirles el uso de las instalaciones y equipo de laboratorio; así como, al Dr. Edgar Tapia por su colaboración en el trabajo de laboratorio.

LITERATURA CITADA

1. Rosenbush RF. Biology and taxonomy of the mycoplasmas. In: Whitford HW, Rosenbush RF, Lauerman LH, editors. *Mycoplasmosis in animals: Laboratory diagnosis*. 1st. ed. The Mycoplasmosis Committee of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, USA: Iowa State University Press; 1994:3-11.
2. Koshimizu K, Harasawa R, Pan IJ, Kotani H, Ogata M, Stephens EB, Barile MF. *Ureaplasma gallorale* sp. Nov. from the oropharynx of chickens. *Int J Syst Bacteriol* 1987;(Oct):333-338.
3. Stemke GW, Robertson JA. *Ureaplasma gallorale*, an isolate from chickens is most closely related to the human isolate *U. urealyticum*. *Int J Syst Bact* 1996;(Oct):1183-1184.
4. Stipkovits L. The pathogenicity of avian Mycoplasmas. *Zentralbl Bakteriol (Orig A)*. 1979;(Oct, 245:1-2):171-83.
5. Koshimizu K, Magaribuchi T. Biological and serological characterization of *Ureaplasmas* isolated from domestic fowls and red jungle fowls. *Jap J Vet Sci* 1978;(40):719-727.
6. Koshimizu K, Kotani H, Magaribuchi T. Isolation of *Ureaplasmas* from Poultry and experimental infection in chickens. *Vet Rec* 1982;(110):426-429.
7. Koshimizu K, Kotani H, Yamamoto K, Magaribuchi T, Harasawa R, Ito M, Ogata M. Serological analysis of *Ureaplasmas* isolated from various animals. *Isr J Med Sci* 1984;(Oct 20:10):950-953.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to express their gratefulness to Diagnósticos Clínicos Veterinarios S. A. de C. V. for allowing the use of their facilities and laboratory equipment. Likewise, the authors express their gratefulness to Dr. Edgar Tapia for his collaboration in the laboratory work.

End of english version

8. Stipkovits L, Brown PA, Glavits R, Julian RJ. The possible role of *Ureaplasma* in continuous infertility problem in turkeys. *Avian Dis* 1983;(27):513-523.
9. Stipkovits L, Brown PA, Glavits R, Zajer J. Significance of *Ureaplasma* infection in infertility of turkeys. *Arch Exp Veterinarmed* 1986;(Jan 40:1):103-104.
10. Jordan FTW, ErnØ H, Cottew GS, Hinz KH, Stipkovits, L. Characterization and Taxonomic description of five *Mycoplasma* serovars (serotypes) of avian origin and their evaluation to species rank and further evaluation of the taxonomic status of *Mycoplasma synoviae*. *Int J Syst Bacteriol* 1982;(32):108-115.
11. Goll FJr. Identification of *Mycoplasmas* isolated from domestic animals. In: Whitford HW, Rosenbush RF, Lauerman LH, editors. *Mycoplasmosis in animals: Laboratory diagnosis*. 1st. ed. The Mycoplasmosis Committee Am Assoc Vet Lab Diagnos, USA: Iowa State University Press; 1994:15-30.
12. Jordan FTW, Amin M. A survey of *Mycoplasma* infections in domestic Poultry. *Res Vet Sci* 1980;(28):96-100.
13. Bradbury JM, Forrest M, Williams A. *Mycoplasma lipofaciens*, a new species of avian origin. *Int J Syst Bacteriol* 1983;(33):329-335.
14. McClenaghan M, Bradbury JM, Howse JN. Embryo mortality associated with avian *Mycoplasma* serotype I. *Vet Rec* 1981;(108):459-460.
15. Kleven SH. *Mycoplasmosis*. In: Swayne DE, Glisson JR, Jackwood MW, Pearson JE, Reed WM, editors. *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens*. 4th. ed. USA: The American Association of Avian Pathologists, 1998:74-80.
16. Zain ZM, Bradbury JM. The influence of type of swab and laboratory method on the recovery of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in broth medium. *Avian Pathol* 1995;(24):707-716.
17. Gentry RF. Survival of *Mycoplasma* in broth and semi-solid media. *Avian Dis* 1960;(4):436-443.
18. Kleven, SH. Laboratory Techniques for avian *Mycoplasmas*. In: Proceed of *Mycoplasma Diagnostic Workshop*. Univ of Georgia, Poultry Diag Res Center, and the USDA, Anim Plant Health Inspection Serv, Nat Poultry Improv Plan, editors. Georgia, USA: University of Georgia Press; 2000.
19. Bradbury JM. Rapid biochemical tests for characterization of the *Mycoplasmatales*. *J Clin Microbiol* 1977;(5):531-534.