

25



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES DE CUAUTITLAN

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES DE CUAUTITLAN



“DESARROLLO DE UNA PRUEBA DE INMUNOPEROXIDASA INDIRECTA PARA IDENTIFICAR *Mycoplasma hyopneumoniae* EN TEJIDO PULMONAR PORCINO”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

CLAUDIA LEON SANCHEZ

ASESOR. M EN C TONATIUH A. CRUZ SANCHEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO. 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA 14
MEXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Exámenes Profesionales

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos:

Desarrollo de una prueba de Inmunoperoxidasa

Indirecta para identificar Mycoplasma

hyopneumoniae en tejido pulmonar porcino.

que presenta la pasante Claudia León Sánchez

con número de cuenta: 8809321-1 para obtener el título de:

Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 18 de Enero de 2001

PRESIDENTE MVZ. Gerardo Cruz Jiménez

VOCAL M. en C. Tonatiuh Cruz Sánchez

SECRETARIO M. en C. Andres Romero Rojas

PRIMER SUPLENTE MVZ. Angel Germán Martínez Sosa

SEGUNDO SUPLENTE MVZ. Mercedes Salgado Moreno

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Virología del Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 1 y con el apoyo del proyecto PADEP UNAM 100001 con la dirección del Dr. Tonatiuh A. Cruz Sánchez y la asesoría del M. en C. Edgar Aguilera Cerón y del Dr Abel Ciprián Carrasco.

AGRADEZCO

A Misael y Dolores (mis padres) y también a Rossana, Paul y Adrián (mis hermanos) por TODO.

A Héctor R. R. porun poco de todo.

Al Dr. Tonatiuh A. Cruz Sánchez por su dirección y por el tiempo dedicado a ella.

Al M. en C. Edgar Aguilera por las constantes asesorías brindadas, por el tiempo y el interés que le dedicó a este trabajo.

Al Dr. Abel Ciprián por permitir que el trabajo se elaborara en el Laboratorio de Virología, así como por brindar los recursos para ello.

A la Dra. Susana Mendoza Elvira, por haberme brindarme todos los recursos (material y espacio), su asistencia técnica y sobre todo, la donación de las cepas y de los sueros de referencia utilizados para el desarrollar del proyecto.

Al Dr. Eliseo Hernández-Baumgarten por facilitar el uso del microscopio de fluorescencia del Laboratorio de Microscopia Electrónica de la FESC, Campo 1.

Al M. V. Z. Víctor Quintero por proporcionar muestras pulmonares.

Al Ingeniero Juan José Garibay Bermúdez por su asesoría en la evaluación e interpretación de los resultados obtenidos.

A los sinodales, M.V.Z. Gerardo Cruz J., Dr. Andrés Romero R., M.V.Z. Angel Martínez S. y la M.V.Z. Mercedes Salgado M. por haber revisado y dado su opinión con miras a mejorar el trabajo.

A Claudia, Edith, Lilia, Verónica, Gabriela, Marco, Miguel, Gamaliel y Carlos por su amistad.

A Tí , que por lo menos, tomaste desempolvaste y estas leyendo esto, de este ejemplar.

INDICE GENERAL

Indice de Tablas y Cuadros	I
Indice de Figuras	I
Abreviaturas	II
RESUMEN	III
I INTRODUCCION	1
1.1 Neumonía Enzoótica	1
1.2 Pruebas Inmunohistoquímicas	10
II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
2.1 Justificación	15
2.2 Hipótesis	16
2.3 Objetivos	16
III METODOLOGIA	17
3.1 Titulación de sueros de conejos inmunizados con <i>M. hyopneumoniae</i>	17
3.2 Titulación del anticuerpo secundario o conjugado	17
3.3 Controles	18
3.4 Selección y preparación de las muestras pulmonares	20
3.5 Procesamiento de las muestras para el aislamiento e identificación del micoplasma	21
3.6 Técnica de Inmunofluorescencia Directa	22
3.7 Técnica de Inmunoperoxidasa Indirecta	23
3.8 Evaluaciones de las pruebas.	24
IV RESULTADOS	25
V DISCUSION	37
VI CONCLUSIONES	43
VII ANEXOS	44
VIII REFERENCIAS	48

Lista de Cuadros y de Tablas de resultados.

Cuadro 1	Taxonomía del <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .	2
Cuadro 2	Algunas propiedades de la Clase Mollicutes.	3
Cuadro 3	Métodos de Inmunoperoxidasas más utilizados.	13
Tabla 1	Resultados de los controles pulmonares y cepas de referencia en las pruebas de Inhibición del crecimiento y dependencia de esteroides (sobre agar).	26
Tabla 2	Resultados de cada una de las muestras con las pruebas de Inhibición del Crecimiento (IC), Inmunofluorescencia Directa (IFD) e Inmunoperoxidasa Indirecta (IPI) de las 56 muestras problema.	28
Tabla 3	Resumen de resultados de las 56 muestras problema en las pruebas de la Inhibición del Crecimiento (IC), Inmunofluorescencia Directa (IFD) e Inmunoperoxidasa Indirecta (IPI).	29
Tabla 4	Combinación de resultados de las 56 muestras en las pruebas de IC, IFD e IPI.	33
Tabla 5	Sensibilidad y Especificidad de la prueba de Inmunoperoxidasa Indirecta (IPI).	35
Tabla 6	Sensibilidad y Especificidad de la prueba de Inmunofluorescencia Directa (IFD).	36

Lista de Figuras

Figura 1	Esquema del tren de fijación de la prueba de Inmunoperoxidasa Indirecta.	14
Figura 2	Laminilla de reacción positiva de Inmunofluorescencia Directa.	30
Figura 3	Laminilla de reacción positiva de Inmunoperoxidasa Indirecta.	31
Figura 4	Laminilla negativa de Inmunoperoxidasa Indirecta.	32

ABREVIATURAS

ABTS	2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)
AL	Aglutinación de látex
ASB	Albúmina sérica bovina
ATCC	American Type Cells and Cultures, Células y Cultivos Tipo Americano
c.b.p.	Cuanto baste para
DAB	3-3-diaminobencidina
ELISA	Ensayo ligado a una enzima
FC	Fijación del complemento
IC	Inhibición del crecimiento
IF	Inmunofluorescencia
iFD	Inmunofluorescencia directa
IP	Inmunoperoxidasa
IPI	Inmunoperoxidasa indirecta
<i>M. f.</i>	<i>Mycoplasma flocculare</i>
<i>M. h.</i>	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>
<i>M. hr.</i>	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>
N. E.	Neumonía Enzoótica
N.V.S.L.	National Veterinary Services Laboratories, Laboratorios Nacionales de Servicios Veterinarios
PBS	Amortiguador de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
U. V.	Ultravioleta
x g	Gravedades

RESUMEN

Dentro de las enfermedades que afectan al ganado porcino se encuentra la Neumonía Enzoótica a la que se le considera como una enfermedad infecto contagiosa, de carácter crónico y que ocasiona pérdidas económicas considerables, pues en general la morbilidad es alta e involucra a individuos jóvenes y adultos. Clínicamente es imperceptible (lo que favorece su diseminación provocando enzootias). Las lesiones que provoca se localizan en los pulmones, en los lóbulos apical y cardíaco, con una coloración gris purpúrea; histológicamente se da una hiperplasia linfocítica.

El agente causal de la enfermedad es el *Mycoplasma hyopneumoniae*; en general los micoplasmas son organismos cuyo aislamiento y crecimiento en el laboratorio es muy laborioso y complicado, impidiendo con ello que el diagnóstico de la enfermedad se de por métodos tradicionales (aislamiento y pruebas bioquímicas). Actualmente se han implementando técnicas serológicas e inmunohistológicas (inmunofluorescencia) para su diagnóstico.

La finalidad de este trabajo fue el adaptar o desarrollar una prueba de inmunoperoxidasa indirecta como método de diagnóstico para dicho padecimiento y evaluarla frente a poblaciones de animales sanos y enfermos determinadas bajo la conjunción de varios parámetros (signos, características histológicas de las lesiones, aislamiento y prueba de inhibición del crecimiento) y también, comparar los resultados y la metodología de ella con la de la prueba de inmunofluorescencia directa (reconocida como prueba diagnóstica para la enfermedad).

De los resultados que se obtuvieron entre las pruebas de inmunofluorescencia directa e inmunoperoxidasa indirecta con respecto a la de inhibición de crecimiento, no existe diferencia entre los resultados que de cada una de ellas se

obtuvieron. La prueba de inmunoperoxidasa indirecta obtuvo una sensibilidad de 97.56% y una especificidad de 80.00% concluyendo que puede ser una alternativa en el diagnóstico de la Neumonía Enzoótica puesto que es una prueba poco laboriosa y confiable ya que sus resultados son reproducibles.

I INTRODUCCION

1.1 NEUMONIA ENZOOTICA

La Neumonía Enzoótica (N. E.) es una enfermedad centro de diferentes estudios, tanto por el cuadro clínico que provoca como por las consecuencias productivas o zootécnicas que conlleva (principalmente la baja en la calidad del producto final y pérdidas económicas). Se tiene conocimiento de su existencia desde hace aproximadamente 100 años, se comenzó a estudiar detenidamente entre los años de 1931 y 1950, siendo hasta el año de 1965 cuando se logró aislar y caracterizar a su agente causal, el *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. h.*), mismo que pertenece a la Clase de los Mollicutes (Cuadros 1y 2) y cuyas características biológicas han representado un problema para el diagnóstico de la enfermedad (29, 55, 60).

La N. E. es una enfermedad común entre el ganado porcino. A nivel mundial, se ha reportado que de un 85% a un 95% de los animales la padecen en algún momento de su vida y de estos hasta un 70% presenta lesiones que se pueden apreciar al sacrificio, esto último depende de la edad en que cada animal quedó infectado y el tiempo que le llevó recuperarse, sin embargo, no es causa de mortalidad (3, 29).

Económicamente es importante ya que está asociada al retardo en el crecimiento de los animales que la padecen (que va de un 9 a 16% menos al que tienen los animales sanos), reflejándose en la pérdida de un 10 a un 14% de la conversión alimenticia y trayendo como consecuencia el invertir más tiempo, mantenimiento, alimentación, medicación, etc., en su desarrollo. Sin embargo, dado que la enfermedad predispone a infecciones secundarias, tanto virales como bacterianas, se pueden presentar mayores pérdidas pues por lo general, son las sinergias que se dan con ellas las causas de un adelgazamiento progresivo

Cuadro 1. Taxonomía del *Mycoplasma hyopneumoniae* (47, 57, 63).

REINO		DIVISIÓN	CLASE	ORDEN	FAMILIA	GENERO	ESPECIES		
Según Whittaker	Según Woese	(De acuerdo a la presencia o ausencia de pared celular)							
Monera o Procaryote	Archeobacteria								
	Cianobacteria								
	Bacteria (Eubacterias)		Gracilicutes						
			Firmicutes						
			Tenericutes		Mollicutes	Mycoplasmatales	Mycoplasmataceae	Mycoplasma	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> M. spp.
								Ureplasma	
							Spiroplasmataceae		
							Acholeplasmatales		
							Anaeroplasmatales		
			Mendosicutes						
Protista									
Plantae									
Fungi	(Eucaryotes)								
Animalia									

Cuadro 2. Algunas propiedades de la Clase Mollicutes (53, 55, 66, 68).

Clasificación		Propiedades distintivas de cada familia y género	Habitat
Orden I Mycoplasmatales			
Familia I	<i>Mycoplasmataceae</i>	Necesitan esteroides (colesterol) para su crecimiento	
Género I	<i>Mycoplasma</i>	No hidrolizan urea, hidrolizan arginina	Humanos animales, plantas e insectos
Género II	<i>Ureplasma</i>	Hidrolizan urea, no hidrolizan arginina	Humanos y animales
Familia II	<i>Spiroplasmataceae</i>	Filamento helicoidal	
Género I	<i>Spiroplasma</i>		Sólo parasitan artrópodos y plantas
Orden II Acholeplasmatales			
Familia I	<i>Acholeplasmataceae</i>	No hidrolizan urea ni arginina, no necesitan colesterol, resisten concentraciones elevadas de digitonina	
Género I	<i>Acholeplasma</i>		Animales, plantas e insectos
Orden III Anaeroplasmatales			
Familia I	<i>Anaeroplasmataceae</i>	Anaerobios obligados	
Género I	<i>Anaeroplasma</i>		Bovinos y ovinos
Género II	<i>Asteroplasma</i>		Plantas e insectos

de los cerdos e inclusive del deceso de los animales afectados (1, 7, 8, 12, 45, 51, 60, 64).

La N. E. es una enfermedad que por sí sola no causa un cuadro clínico severo, se caracteriza por la presencia de tos seca, respiración abdominal, sobre todo cuando los animales se agitan, ligero incremento en la temperatura, de 1 a 1.5 °C, y ocasionalmente ligeros escurrimientos nasales. En la mayoría de los casos la enfermedad pasa inadvertida por el personal encargado, favoreciendo su diseminación en las granjas (enzootias) y el estado crónico en algunos de los animales (29, 55).

Si bien la edad no es un factor predisponente de la enfermedad, son las primeras semanas de vida (entre la segunda y la sexta) donde por lo general son más susceptibles los lechones. Al parecer las portadoras del micoplasma son las hembras jóvenes (con baja inmunidad) las cuales lo transmiten a los lechones, por medio de aerosoles o secreciones nasales, y ellos a su vez, lo transmiten a otros lechones al ser reagrupados en el momento del destete. Se presume que el tiempo de incubación y el tiempo que tardan en manifestarse los signos de la enfermedad se da entre los 5 y los 16, días en lechones de 2 a 6 semanas de edad, dependiendo del tiempo de exposición, concentración y virulencia de la cepa a la que se expongan los animales, así como de la capacidad de respuesta de cada uno de ellos ante la infección (4, 22, 48, 55).

El *M. h.* penetra en el aparato respiratorio del cerdo con el aire inspirado. Por sus pequeñas dimensiones, que van de 0.1 a 0.2 μ , evade los mecanismos de defensa mucociliar (movimiento ciliar) pero también los altera y llega a los cilios de las células epiteliales del área cardioventral del pulmón, esto es, los lóbulos apical y cardíaco derechos, estableciéndose y colonizando mediante ciertos mecanismos de citoadsorción, pues aunque se ha demostrado la existencia de adhesinas u organelos en la superficie del micoplasma (de origen protéico y glicoprotéico) y

la existencia de receptores en la superficie de las células del tracto respiratorio del cerdo a los que se fija el micoplasma al parecer específicamente, los mecanismos por los cuales se establece y coloniza el epitelio alveolar son desconocidos. Así mismo se ha visto que libera varios metabolitos (proteínas citotóxicas, factores mitogénicos) que favorecen su adhesión y posterior reproducción en el epitelio pulmonar (12, 21, 44, 61, 69, 70, 71, 73).

Algunos de estos factores han sido señalados como la causa de la alteración de la respuesta inmune por parte del animal infectado pues al parecer el micoplasma posee algunas propiedades de inmunomodulación reflejándose en la alteración de los linfocitos T y la reducción fagocítica dada por una alteración en la función de los macrófagos alveolares. Otro factor importante es que después de haber tenido contacto con los linfocitos, el micoplasma presenta en su superficie antígenos linfocitarios parecidos a los del hospedero, desviando la respuesta que se pudiera montar contra él, dando origen a una respuesta autoinmune en contra del propio tejido pulmonar, alterando o dañando al mecanismo de defensa mucociliar (se observa primero la disminución de la función de los cilios de las células epiteliales de los bronquios, luego la pérdida de los cilios y por último, la de las células que los contenían), disminuyendo la capacidad de eliminarlo a él, así como a otros agentes oportunistas. Sin embargo no se han encontrado evidencias de que pueda o tenga características invasivas (6, 8, 12, 32, 44).

Los cambios que se dan en el tejido pulmonar son el reflejo de la respuesta inmunológica, con la presencia de poca inflamación y secreción (la que es escasa pero constante). Las lesiones que desarrolla la N. E. en el pulmón se presentan a simple vista como áreas colapsadas o consolidadas bien demarcadas, de consistencia poco firme y coloración gris-purpúreo; manteniéndose de esta forma durante toda la infección y distinguiéndose claramente del tejido pulmonar sano que es de color rosado, de consistencia más

firme y sin la presencia exudado catarral en bronquios (55, 62).

Histológicamente la lesión está caracterizada por un incremento en el número de linfocitos en los tejidos perivasculares, peribronquiales y peribronquiolares, mientras que en las áreas de las paredes alveolares y de la lámina se acumulan polimorfonucleares. Según avanza la enfermedad se aprecia la pérdida de cilios y posteriormente la de las células a las que pertenecían. A la par puede observarse, una mayor proliferación del tejido y el aumento de secreción. Puede decirse que una característica constante es, una hiperplasia bronquial del epitelio, con una progresiva y persistente hiperplasia linfoide. Cabe destacar que los espacios alveolares no son invadidos por mononucleares o polimorfonucleares, lo que si sucede en otro tipo de neumonías (ocasionalmente los neutrófilos y macrófagos son encontrados en la luz de bronquios y bronquiolos) (4, 14, 23, 55).

La recuperación de las lesiones se da poco tiempo después, sin embargo ésta es parcial, pues se pueden seguir apreciando áreas consolidadas y colapsadas de color rojo, fisuras y una leve fibrosis que parece segmentar los lóbulos. Los alveólos pueden quedar colapsados y con una ligera hiperplasia de los nódulos linfáticos (12, 23, 48, 67).

El tiempo en el que se manifiesta la infección así como el de su resolución, es muy variado pues depende de factores tales como la virulencia de la cepa involucrada (la expresión de proteínas o glicoproteínas), el estado y respuesta de cada animal y de los cuidados que se les prodigan; aún así, se ha concluido que entre la tercera y quinta semana de que se presenta la infección, se detectan los mayores daños en el pulmón y alrededor de la novena y décima semanas queda resuelta. Por su parte la resolución, esta ligada o correlaciona con el tiempo en que se da la producción de IgG y/o sensibilización de linfocitos de torrente sanguíneo aunque los anticuerpos confieren poca protección en los animales infectados (9, 43, 48, 55, 67, 72).

Por lo antes mencionado (inmunomodulación, autoinmunidad e interferencia con la remoción microbiana), la presencia del micoplasma se considera un factor predisponente para el establecimiento de infecciones bacterianas o virales secundarias. Entre los agentes involucrados en segundas infecciones se encuentran *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Salmonella choleraesuis*, *Bordetella bronchiseptica* y adenovirus. Así, la asociación o sinergia del *M. h.* con otros factores es lo que ocasiona pérdidas económicas graves en las granjas donde el micoplasma este presente (12, 22, 23, 55, 67).

Entre los principales factores predisponentes para la infección del micoplasma están una deficiente alimentación, el estrés, cambios de clima bruscos, mala ventilación, temperaturas inestables, infecciones virales pasajeras y el hacinamiento. Así pues, evitando la presencia de estos factores y con las medicaciones y vacunaciones adecuadas, la N. E. no causa retraso en el crecimiento de los animales (55, 68).

Cuando la enfermedad se manifiesta, los tratamientos a seguir se basan principalmente en el uso de tetraciclinas, tilosinas, clortetraciclinas y sulfaminas. En cuanto a las vacunas no se ha desarrollado una que realmente confiera inmunidad, pues por la baja antigenicidad de la membrana del micoplasma así como por la semejanza de ésta con la de los mamíferos, la protección que confiere es baja, no duradera y en algunos casos producen lesiones al ser inoculadas (en la vía por la que se administra) debido a los adyuvantes utilizados (30, 31, 33, 34, 43).

El diagnóstico de padecimientos en los que intervienen procesos bacterianos en animales y que comprende el evaluar los signos que presenta el animal, los daños a nivel macroscópico y microscópico de los órganos afectados, del aislamiento y la identificación con pruebas bioquímicas del microorganismo

causal del daño, involucran actualmente a pruebas de orden serológico, histoquímico o la identificación de material genético, dependiendo del agente causal en cada uno de ellos (24).

En el caso de la N. E. un diagnóstico presuntivo se basa en la sintomatología que presenta el cerdo y una vez sacrificado, en la observación de las lesiones que se encuentren en los pulmones, a niveles macroscópico y microscópico. En otros padecimientos, el procedimiento a seguir es el aislamiento y correcta identificación, no obstante, dada la naturaleza y características del micoplasma, su identificación confirmatoria por medio de pruebas bioquímicas es muy poco práctica, entre otras causas porque requiere de varias semanas para su aislamiento y crecimiento, así mismo es necesario emplear medios enriquecidos, relativamente costosos y laboriosos en su preparación. Entre los componentes que se adicionan al medio están infusión de cerebro y corazón, extracto de levadura, ADN, y suero equino o porcino, con el objetivo de proporcionar al micoplasma los compuestos que no es capaz de sintetizar y que originalmente los toma de las células al momento de infectar el pulmón (como peptonas, enzimas digestivas, NADH, iones y minerales, aminoácidos, ácidos grasos esenciales, colesterol, fosfolípidos y vitaminas principalmente). Otro inconveniente es el pobre rendimiento que se obtiene de los cultivos lo que impide el poder contar con suficientes células de micoplasma con las que se puedan inocular las subsecuentes pruebas; además, es muy común que se obtengan falsos negativos pues generalmente la cantidad de micoplasma en el pulmón no es suficiente para su reproducción en medios sintéticos, por lo cual, es necesario contar con más pruebas que verifiquen con mayor confiabilidad la presencia de la enfermedad (53, 66).

En sí, el diagnóstico rutinario de la N. E. por medio de la evaluación de la lesión y por el aislamiento puede verse alterado, pues las lesiones de N. E. en ocasiones son confundidas por las producidas por algún tipo de lesión o infección ajenas a

la enfermedad (la influenza, por ejemplo) y si la causa del daño es la presencia del micoplasma, en la mayoría de los casos no puede ser aislado pues se pierde en los pasos que se siguen para ello (principalmente en el macerado de la muestra pulmonar); por otro lado en algunos casos de pulmones sin lesiones se llega a aislar el micoplasma (3, 27, 28, 42, 52).

Por lo tanto, se han desarrollado pruebas inmunológicas para confirmar su diagnóstico, tanto serológicas como inmunohistoquímicas (53, 62, 66).

En general, las técnicas serológicas como la fijación de complemento (FC), la aglutinación de látex (AL) y el ensayo ligado a una enzima (ELISA), han demostrado ser sensibles y específicas permitiendo ocuparlas como pruebas diagnósticas en diferentes tipos de padecimientos; sin embargo, en el caso de la N. E. a nivel de campo, la eficacia diagnóstica de cada una de ellas se ha visto alterada pues se presentan frecuentemente falsos negativos y positivos en estas pruebas ocasionados los primeros por la pobreza inmunogénica del micoplasma y los segundos se atribuyen principalmente a que el *M. h.* tiene antígenos membranales semejantes a los que presentan el *Mycoplasma flocculare* (*M. f.*) y el *Mycoplasma hyorhinis* (*M. hr.*). En el caso particular de los lechones, los anticuerpos producidos por la infección no pueden ser diferenciados de los que ellos obtienen por medio del calostro (10, 15, 17, 19, 58).

Las técnicas que hasta el momento han sido más certeras en el diagnóstico de la N. E., son las de FC y ELISA. La prueba de FC detecta anticuerpos en las primeras semanas posteriores a la infección y tiene relación con la observación de lesiones a nivel microscópico, sin embargo no diferencia entre animales enfermos y convalecientes; por su parte, la prueba de ELISA ha resultado ser más sensible pues detecta anticuerpos desde la primera y la segunda semanas pos-exposición hasta 15 semanas posteriores a ésta y correlaciona con los daños en el pulmón (2, 5, 15, 40, 49, 56).

Técnicas como la de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que a pesar de ser muy sensibles y específicas, resultan todavía, ser muy poco costeables para el diagnóstico de la enfermedad y sobre todo, en el monitoreo de las granjas porcícolas (58).

Dentro del grupo de pruebas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas se encuentran las pruebas de Inmunofluorescencia (IF) e inmunoperoxidasa (IP), pero hasta ahora, la más empleada en la detección del micoplasma sobre tejido pulmonar ha sido la primera (53, 66).

Estas últimas han demostrado ser tan sensibles y específicas como las serológicas pero con la ventaja de disminuir el error de un falso positivo causado por el cruce antigénico entre micoplasmas, ya que pueden utilizarse anticuerpos específicos que pueden identificar directamente al micoplasma sobre el tejido (26, 27, 28).

1.2 PRUEBAS INMUNOHISTOQUIMICAS

El grupo de pruebas inmunocitoquímicas o inmunohistoquímicos tienen su fundamento en la identificación de un antígeno determinado por medio de un anticuerpo específico, al igual que en otras pruebas de tipo inmunológico, pero con la característica de que los antígenos forman parte o pueden ser observados en la estructura de la que inicialmente provienen, esto es, cortes de tejido u otro preparado como extendidos o improntas celulares; permitiendo estudiar las características morfológicas, la localización de compuestos hísticos y celulares en procesos o condiciones normales o patológicas (como la producción de isoenzimas, marcadores tumorales), o identificar otro tipo de compuestos y partículas tales como virus, bacterias, anticuerpos, etc. en dichas estructuras.

Dicho material además, sirve de soporte para las posteriores reacciones que tienen como fin el visualizar la presencia de determinado elemento con sustancias coloridas (marcador que por si mismo pueda ser identificado como los fluorocromos) o la formación de ellas (que necesite de reacciones posteriores para que pueda ser evidenciada su presencia). De aquí se desprende la división de las pruebas Inmunocitoquímicas, las pruebas de IF y las de IP (24, 36, 39).

Las pruebas de IF fueron las primeras en ser desarrolladas y se caracterizan por el uso de compuestos fluorescentes o fluorocromos conjugados a los anticuerpos que, indirecta o directamente quedan unidos al antígeno y son observados con un microscopio de luz ultravioleta (U.V.) El isotiocianato de fluoresceína es el fluorocromo más utilizado y el que puede ser observado haciendo incidir sobre la preparación luz entre 450 y 490 nm de λ y con un filtro amarillo puede observarse de color amarillo-verde sobre las preparaciones; éstas no permiten ser conservadas por tiempos prolongados pues la energía luminosa se pierde al paso de los días pues se deteriora o se pierde la fluorescencia del compuesto (25, 39).

Por su parte las pruebas de IP utilizan como marcador a la enzima peroxidasa (extraída del rábano picante y de donde toma nombre la prueba). El uso de enzimas, en este caso la peroxidasa, ha ampliado la variedad de funciones debido a que se pueden ocupar varios sistemas sustrato-cromógeno según las necesidades de cada caso. En general los sistemas más utilizados son aquellos que como producto final forman un precipitado insoluble, en solventes orgánicos, sobre el sitio donde se encuentra la peroxidasa (y por consiguiente, el antígeno en estudio) permitiendo contrateñir y fijar con resina las preparaciones. Entre estos sistemas se encuentra el de H_2O_2 -diaminobencidina (donde la enzima reduce el peróxido de hidrogeno y posteriormente se oxida la diaminobencidina) cuyo producto final es un precipitado de color café-marrón (20, 24, 36).

Los pasos por los que la peroxidasa queda unida con el antígeno depende de la

modalidad de la prueba cuyas principales variantes son: prueba directa, prueba indirecta, sistema peroxidasa-antiperoxidasa o complejo avidina-biotina. Entre estas variantes, la amplificación de la coloración, producto de la cantidad de peroxidasa ligada al sistema de coloración es su característica principal de diferenciación. Sin embargo, ello involucra un gasto mayor en reactivos, aumentando el costo de la prueba. No obstante, cada una de ellas ha demostrado ser satisfactoria en sus resultados cuando se cuenta con material de buena calidad (principalmente el buen funcionamiento de los anticuerpos involucrados) y una técnica bien montada (Cuadro 3). En todos los casos se tiene la alternativa de poder conservar las preparaciones mediante su fijación en resinas o su contratinción sin afectar sus características iniciales y sobre todo, el que pueden ser observadas con microscópios ópticos (20, 24, 36, 41).

Así, el fundamento de la prueba de IPI se basa en tres reacciones principales que tiene como base un corte histológico o impronta donde se encuentre el antígeno a ser estudiado: 1) la identificación de un antígeno con un anticuerpo primario homólogo y específico al antígeno y que posterior a una incubación adecuada, 2) se aplica e incuba con un anticuerpo secundario conjugado a la enzima (anticuerpo contra el anticuerpo primario proveniente de una especie diferente) y 3) la aplicación e incubación con la solución sustrato-cromógeno más adecuada a los propósitos finales. Todo lo anterior sin olvidar los pertinentes lavados (con una solución adecuada) entre cada paso para eliminar cualquier sobrante de compuesto que pudiera interferir en la tinción (anticuerpos no acoplados principalmente). Finalmente, la lectura de las laminillas se observan con un microscópio óptico y pueden hacerse de ellas tinciones permanentes (Figura 1) (24, 36, 41).

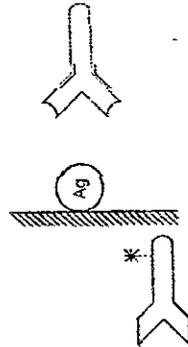
Cuadro 3. Métodos de Inmunoperoxidasa más utilizados (20, 24, 36, 41).

MODALIDAD	PASOS	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Inmunoperoxidasa directa	1.-Unión del antígeno con un anticuerpo específico marcado con peroxidasa y 2 - Solución reveladora	Corto tiempo de tinción.	Contar con un Ac específico marcado con peroxidasa.
Inmunoperoxidasa indirecta	1.-Unión del Ag a un Ac específico 2.-Unión del Ac específico a un anti-Ac conjugado a la peroxidasa 3.- Solución reveladora	No es necesario contar con un Ac específico y aumenta la intensidad de la tinción.	Se dobla el tiempo de tinción.
Puente enzimático	1.-Unión el Ag con Ac específico 2.- Unión de la enzima al Ac esp. 3.- Solución reveladora	Se reducen inespecificidades y aumenta la tinción.	Desperdicio de peroxidasa.
Peroxidasa -antiperoxidasa	1.-Reconocimiento y unión del Ac primario con el Ag 2.-Unión del Ac específico con un anti-Ac (Ac contra el primer anticuerpo y contra la peroxidasa) 3.-unión de la peroxidasa al anti-Ac. 4.- Solución reveladora	Se reducen reacciones inespecíficas y aumenta la intensidad de la tinción.	Aumenta el tiempo de corrimiento, el gasto de reactivos y costo.
Complejo Avidina - biotina	1.-Formación del complejo Ag-Ac 2.-Unión del Ac con un anti-Ac conjugado a avidina 3.-Unión del avidina con el conjugado de biotina-peroxidasa. 4.- Solución reveladora	Se reducen reacciones inespecíficas y aumenta la intensidad de la tinción.	Aumenta el tiempo de corrimiento, el gasto de reactivos y costo.

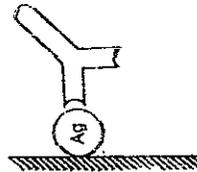
Donde: Ag = antígeno, Ac específico = anticuerpo específico al antígeno (marcado con peroxidasa), anti-Ac* = anticuerpo conjugado a peroxidasa contra la inmunoglobulina correspondiente.

Figura 1. Esquema del tren de tinción de la prueba de inmunoperoxidasa Indirecta.

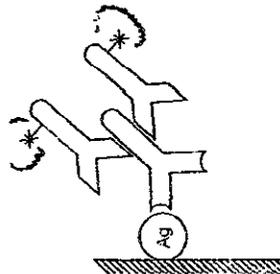
A) Previo bloqueo de la peroxidasa endógena y sitios de unión para anticuerpos inespecíficos, se agrega el anticuerpo primario.



B) Seguido de un lavado adecuado, se agrega el anticuerpo secundario (conjugado a la peroxidasa) al primario.



C) Después de otra serie de lavados, se agrega la solución reveladora; por último se lava la preparación y se observa al microscopio.



II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

2.1 JUSTIFICACION

La N. E. es una enfermedad que debido al agente que involucra, *M. hyopneumoniae*, es difícil de diagnosticar por los métodos tradicionales tales como el aislamiento y las pruebas bioquímicas, por lo que se han buscado nuevas técnicas que evidencien su presencia como son las pruebas de orden inmunológico que detectan anticuerpos contra el micoplasma o en su defecto, que lo localicen sobre el tejido pulmonar por medio de pruebas inmunohistoquímicas, tal es el caso de la IFD que ha sido aceptada como prueba diagnóstica de la N. E. y que no obstante, su aplicación tiene varios inconvenientes (principalmente el que la fluorescencia se pierde con el tiempo impidiendo conservar las preparaciones por largos períodos y que para su lectura es necesario contar con un microscopio de luz fluorescente). En el presente trabajo se montó una prueba de IP ya que presenta ventajas frente a la de IFD (como son el que las preparaciones finales pueden ser leídas en un microscopio óptico, pueden ser conservadas pues son tinciones permanentes que pueden fijarse con resinas). La prueba de IPI en resultados es semejante a las otras modalidades aunque menos costosa, motivos por los cuales fue escogida para ser desarrollada y evaluada con respecto a los métodos de aislamiento-identificación (prueba de Inhibición del crecimiento) e IFD con el fin de proponerla como una alternativa en el diagnóstico de la Neumonía Enzoótica.

2.2 HIPOTESIS

Si la prueba de Inmunoperoxidasa indirecta funciona como prueba diagnóstica, entonces los resultados que se obtengan de las pruebas de Inhibición del crecimiento e Inmunofluorescencia directa serán similares en cada una de las muestras.

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 Objetivo General:

Desarrollo de una prueba de Inmunoperoxidasa Indirecta para detectar al *M. hyopneumoniae* en cortes histológicos de tejido pulmonar de cerdo con lesiones presuntivas de Neumonía Enzoótica.

2.3.2 Objetivos Particulares:

- A) Determinar las poblaciones de animales sanos y enfermos a partir de las muestras seleccionadas.
- B) Estandarizar la prueba de Inmunoperoxidasa Indirecta sobre cortes histopatológicos de tejido pulmonar porcino.
- C) Comparar los resultados obtenidos de las pruebas de Inmunoperoxidasa indirecta (IPI) e Inmunofluorescencia directa (IFD).
- D) Determinar la sensibilidad y la especificidad de la prueba de IPI, comparando los resultados de ésta con la prueba de Inhibición de Crecimiento (o poblaciones de animales sanos y enfermos).

III METODOLOGIA

3.1 TITULACIÓN DE LOS SUEROS DE CONEJOS INMUNIZADOS CONTRA *M. hyopneumoniae*:

Se titularon 3 antisueros de conejos inmunizados con la cepa 194 de *M. hyopneumoniae* (donados por el Dr. Tonatiuh Cruz Sánchez) con una prueba de ELISA indirecta (Anexo 1).

3.2 TITULACION DEL ANTICUERPO SECUNDARIO O CONJUGADO:

Se utilizó un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (Sigma Immunochemicals). Su titulación se realizó mediante la prueba de ELISA Tween 20, empleándose microplicas de poliestireno sensibilizadas con el antígeno de *M. hyopneumoniae* cepa 194 (donada por el Dr. Ross de la Universidad de Iowa) mediante un cuadro de ajedrez de diluciones dobles, utilizando los antisueros de conejo y bajo la técnica de ELISA (indirecto) que a continuación se describe.

Material y método para la titulación de los antisueros (ELISA)(24, 46, 55, 65):

- 1.- Se sensibilizó una placa con 100 µl de solución de antígeno (cepa 194 de *M. hyopneumoniae*, diluido 1:30000 en amortiguador de carbonatos Na₂CO₃/NaHCO₃, pH 9.6, 0.1 M) durante toda la noche a 4 °C.
- 2.- Se retiró el sobrenadante y se colocaron 300 µl de solución bloqueadora de albúmina sérica bovina (ASB) al 3% en amortiguador de carbonatos pH 9.6, 0.1 M, durante 30 min a temperatura ambiente.
- 3.- Se vertió el contenido de la placa y se colocaron 50 µl de solución diluyente de anticuerpos, esto es, una solución de ASB al 1% en amortiguador de carbonatos pH 7.2 – 7.4, 0.1 M, a cada pozo de la placa, posteriormente se

colocaron 50 μ l del suero problema a la primera fila de la misma placa y a partir de este punto, se hicieron las diluciones dobles del suero.

- 4.- Se incubó 1 hr a temperatura ambiente.
- 5.- Vertido el contenido de la placa, se lavó tres veces con solución de Tween 20 al 0.2% en solución de carbonatos, pH 7.2 – 7.4, 0.1 M y se retiró la mayor cantidad de sobrenadante por medio de golpeo.
- 6.- Se colocaron 50 μ l del anticuerpo secundario o anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa, previamente diluido 1:2500 en solución ASB al 1% en amortiguador de carbonatos pH 7.2 – 7.4, 0.1 M.
- 7.- Se incubó a temperatura ambiente por 1hr.
- 8.- Se hicieron otra serie de lavados, tres lavados de 5 min cada uno con solución de carbonatos pH 7.2 – 7.4, 0.1 M con Tween 20 a 0.2% y retirando el sobrenadante.
- 9.- Se agregaron 50 μ l de solución de ABTS en amortiguador de pH 7.2 – 7.4, 0.1 M con H₂O₂ al 0.3%. y se incubó durante 20 min.
- 10.- Sin retirar la solución anterior, se agregaron 100 μ l HCl 1 M como solución de cese de reacción enzimática y se leyó en el espectrofotómetro a 405 nm.

Los sueros se titularon por triplicado y el promedio de los eventos fue considerado como el título de cada uno de ellos. A partir de estos valores se escogió el de mayor título. Como controles negativos se utilizaron pozos sin antígeno, la ausencia de cada uno de las soluciones (antígeno, sueros y conjugado) y suero de conejo no inmunizado; no se utilizó control positivo.

3.3 CONTROLES:

3.3.1 Controles pulmonares:

Como control pulmonar negativo fue elegido el pulmón de un cerdo de aproximadamente tres meses de edad, que provenía de una granja libre de enfermedades respiratorias, que no presentó lesiones macroscópicas de ninguna

índole, del que no se aisló microorganismo alguno y fue negativo a *M. hyopneumoniae* en la prueba de inmunofluorescencia directa.

Las muestras pulmonares utilizadas como controles positivos correspondieron a dos pulmones infectados con el micoplasma; una fue de campo y la otra provino de un cerdo que fue inoculado con la cepa 194 de *M. hyopneumoniae* previamente y sacrificado a las 10 semanas de la inoculación. De las dos muestras se aisló el micoplasma y las pruebas de inhibición del crecimiento (IC), con el antisuero de *M. hyopneumoniae*, e inmunofluorescencia directa fueron positivas en ambos casos (Tabla 1).

3.3.2 Cepas de referencia:

Las cepas de referencia utilizadas fueron: a) cepa 194 de *Mycoplasma hyopneumoniae*, proporcionada por el Dr. Ross de la Universidad de Iowa; b) cepa Ms42 de *Mycoplasma flocculare*, proporcionada por el Dr. Pijoan de la U de Minesota y c) una cepa ATCC de *Mycoplasma hyorhinis* donada por el N.V.S.L, Iowa. De cada una de las cepas se tomaron alícuotas de 50 μ l, se suspendieron en 3 ml de medio líquido y se incubaron durante 10 días en baño maría a 37 °C, se alicuotaron y mantuvieron a 4 °C (el crecimiento de cada una de ellas fue inhibido por su correspondiente antisuero en la prueba de IC). Con ellas se evaluaron los sueros hiperinmunes (en la prueba de IC) y los aislamientos de los pulmones controles (además de las muestras problema).

3.3.3 Sueros hiperinmunes:

Para la prueba de IC se utilizarón antisueros contra *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma flocculare* y *Mycoplasma hyopneumoniae*, que fueron purificados con membranas millipore de 0.22 μ , alicuotados (en 1 ml) y conservados a -20 °C (donados por el N.V.S.L, Iowa).

3.4 SELECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PULMONARES (66):

Las muestras fueron enviadas de los estados de Nuevo León, Puebla y México, y provenían de animales que fueron sacrificados al presentar los signos clínicos de: fiebre (entre dos y tres grados), secreción nasal y sobre todo, que no aumentaban de peso. Sin embargo, de este primer grupo de muestras se seleccionaron aquellos pulmones conservados adecuadamente, de aspecto consistente y cuyas lesiones fueran de color rojo-púrpura y colapsadas, descartando a aquellos cuyas lesiones no correspondían a Neumonía Enzoótica, como hemorragias, edemas o secreciones purulentas. La presencia de pigmentación verdosa o mal olor se consideró como estado de descomposición y también fueron descartadas.

De cada uno de los pulmones así seleccionados, se tomaron muestras aledañas a una misma lesión, en las que estuviera presente un conducto bronquial rodeado por una parte sana y otra dañada, en caso de no presentarse lesión alguna, se tomó una fracción del lóbulo apical derecho, tanto para el proceso de aislamiento e identificación (por medio de la prueba de IC), como para hacer cortes y montar sobre ellos las pruebas de IFD e IPI. Las fracciones destinadas al aislamiento fueron congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y durante un lapso no mayor a 3 días, tiempo en el que se hicieron el macerado y las siembras para el aislamiento.

Las muestras destinadas para corte se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ embebidas en Tissueteck (crioprotector) y el corte histológico de ellas (tanto para IPI como para IFD) se hizo con criostato a $8\text{ }\mu$ o menos de grosor, procurando que el ángulo de corte fuera transversal al bronquio, entre -20 y $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$, se fijaron en acetona a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min y se congelaron a la misma temperatura hasta el momento de su fijación.

Para observar el cruce antigénico con el *Mycoplasma hyorhinis* se trabajó con tres muestras de pulmones infectados experimentalmente con él, mismas que fueron donadas a éste trabajo por el Laboratorio de Virología de la F. E. S. Cuautitlán y se

trataron como las demás muestras (38).

3.5 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL MICOPLASMA:

3.5.1 Aislamiento (53, 66):

Se tomó aproximadamente 1 g de las muestras seleccionadas de cada uno de los tejidos pulmonares, y con ayuda de 3 ml de medio líquido modificado de Friss (ver Anexo 2), se maceró en un homogenizador, posteriormente se centrifugó a 5000 x g durante 15 min, del sobrenadante se tomaron 0.3 ml y se colocaron en un tubo que contenía 3 ml de medio líquido, se agitaron y volvieron a centrifugar; el procedimiento se repitió dos veces hasta contar con tres diluciones de una misma muestra. Los tubos se incubaban por 5 o 6 días a 37 °C. Con el propósito de purificar el cultivo, en algunos casos fue necesario, al término de dicho tiempo, centrifugar nuevamente y filtrar el sobrenadante a través de una membrana millipore de 0.22 μ de ancho de poro, recolectándose el filtrado en otro tubo con medio líquido y se incubaron por espacio de 5 a 6 días.

Una vez obtenidos los cultivos puros, se centrifugaron y se sirvieron sobre medio sólido modificado de Friss y se incubaron en velobiosis de 8 a 12 días, o bien, hasta observar en las cajas, crecimiento característicos del micoplasma. Si en este pase se observaba un crecimiento puro se hizo un último pase a medio líquido, en caso de no ser así, se escogía un grupo de colonias características, se sembraban en medio líquido y se repetía el procedimiento hasta obtener el cultivo puro, se conservaron a 4 °C o se continuaba con las pruebas subsecuentes (Inhibición del crecimiento y Dependencia de esteroides). Cuando no fue posible purificar el cultivo, la muestra fue desechada.

3.5.2 Pruebas de identificación del Micoplasma (53, 66): (A) Dependencia de

Esteroles y (B) Inhibición del Crecimiento (IC).

A) En la prueba de dependencia de esteroides se utilizó una solución de digitonina al 1.5 % en solución alcohólica al 95%, se esterilizó por filtración con membrana de 0.22 μ manteniéndose a 4 °C.

B) Para la prueba de IC se utilizaron los antisueros antes mencionados (sueros hiperinmunes). Procedimiento: Se tomaron de 0.3 a 0.4 ml del decantado de 24 hrs de los cultivos de las muestras y las resiembas de las cepas, se sirvieron sobre medio sólido modificado de Friis permitiendo que evaporara el exceso de líquido, posteriormente se colocaron 30 μ l de cada uno de los antisueros, de la solución de digitonina y de las soluciones controles sobre la superficie del agar impidiendo que se tocaran entre sí y nuevamente se dejó evaporar el exceso de líquido, se incubaron de 5 a 7 días a 37 °C y se leyeron. Se consideró positiva la prueba cuando alguna de las soluciones (antisuero, solución de digitonina, alcohol, etc.) impedía el crecimiento de los microorganismos en el área sobre la que se aplicaba cada una de ellas, y que fuera de un diámetro de 0.5 cm o más. Se utilizaron como controles negativos a sueros humano y caprino inactivados y solución alcohólica al 95%. Como controles positivos se usaron el crecimiento de cada una de las cepas sin soluciones.

3.6 TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA (IFD):

Procedimiento (37):

- 1.- A los cortes de las muestras (controles y problemas) se les aplicó una gota del conjugado de fluorescencia (suero de cerdo purificado y conjugado con isotiocianato de fluoresceína, denominado BEEN-EK y elaborado en la F.E.S. Cuautitlán, UNAM); el liofilizado del conjugado se reconstituyó 1:16 con agua estéril y se colocó sobre los cortes, de tal forma, que quedara

cubierto todo el tejido.

- 2.- Se incubó por 30 min en una cámara húmeda a 37 °C.
- 3.- Se lavó tres veces de 5 min cada una con PBS isotónico, pH 7.2-7.4, 0.1 M.
- 4.- Se leyó en un microscopio de fluorescencia (microscopio C2 WL con lámpara de Mg HB200 W/4 y se utilizó un filtro de excitación azul, VG 12, y un filtro de barrera 50) a 420 nm de λ .

Se usaron los controles pulmonares y como un control negativo adicional no se colocó el conjugado en cortes seriados de cada muestra.

3.7 PRUEBA DE INMUNOPEROXIDASA INDIRECTA (IPI):

Procedimiento de la prueba (13, 41):

- 1.- Se colocaron los cortes (de controles pulmonares y muestras problemas) en metanol absoluto con 0.1 % de H₂O₂ al 3% por 60 min.
- 2.- Se lavaron las laminillas con solución de PBS isotónica (KH₂PO₄.12 H₂O/ KH₂PO₄ pH 7.2 - 7.4, 0.1 M) 3 lavados de 3 min cada uno.
- 3.- Se retiró la mayor cantidad de sobrenadante y se colocó una gota de anticuerpo primario diluido previamente 1:1000 (en una solución de caseinato de calcio al 0.5% o ASB al 3%, en PBS pH 7.4, 0.1 M), en cada uno de los cortes cubriéndolos completamente.
- 4.- Se les incubó a temperatura ambiente durante 90 min en cámara húmeda.
- 5.- Transcurrido el tiempo de incubación, se hizo una segunda serie de lavados a las mismas condiciones que en el paso 2.
- 6.- Se retiró el sobrenadante y se agregó el anticuerpo secundario, diluido con anterioridad 1:1000 (en una solución de caseinato de calcio al 0.5% o ASB al 3%, en PBS pH 7.4, 0.1 M), procediendo de manera semejante al primario.
- 7.- Se incubó a iguales condiciones (90 min a temperatura ambiente en

cámara húmeda).

- 8.- Se lavó a iguales condiciones que en el paso 2.
- 9.- Se puso la solución de revelado de 3 a 4 μg DAB (3,3-diamino benzidina) en 5 ml de Tris-HCl 0.05 M, pH 7.6 y 10 μl de H_2O_2 al 3% e incubó de 20 min, transcurridos los cuales se enjuagaron las laminillas con agua destilada.
- 10.- Se observaron en el microscopio óptico.

Además de los controles pulmonares positivos y negativos, la ausencia de cada uno de los reactivos y un suero de humano se usaron como controles negativos.

3.8 EVALUACIONES DE LAS PRUEBAS:

La sensibilidad y especificidad de la prueba de Inmunoperoxidasa indirecta, y también para la de Inmunofluorescencia directa, se obtuvieron a partir de una tabla 2 x 2 (Anexo 3) (11, 18, 24, 35).

IV RESULTADOS

4.1 TÍTULO DE CONJUGADO DE PEROXIDASA:

Se determinó un título del conjugado de 1:3200 a partir de la prueba de ELISA.

4.2 TITULACIÓN DE ANTISUEROS:

Los tres antisueros tuvieron un título de 1:2046 a partir de la prueba de ELISA.

4.3 TITULACION DE SUERO Y CONJUGADO EN CORTES HISTOLOGICOS PARA LA PRUEBA DE IPI:

Se obtuvieron bajo los pasos estandarizados e indicados como Prueba de IPI mediante una prueba de ajedrez realizada sobre los cortes de los pulmones controles. La dilución óptima del anticuerpo primario o suero elegido fue de 1:1000 y la del anticuerpo secundario (inmunoglobulina de cabra anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa) fue de 1:1000. En su dilución se utilizó una solución de caseinato de calcio al 0.1% en PBS, pH 7.4, 0.1 M.

4.4 RESULTADOS DE LOS CONTROLES:

En las pruebas de dependencia de esteroides e inhibición de crecimiento (IC). Los resultados que en ella se aprecian, demostraron que tanto las muestras control como las cepas de referencia fueron confiables. En ellas, se consideró una identificación positiva al no haber replicación en una zona mayor a 5 mm de diámetro a partir del punto donde se aplicó el suero o la solución de digitonina. En la prueba de IC, cada suero identificó a la cepa análoga con zonas de inhibición sobre el agar de 5 a 7 mm de diámetro. Con la de dependencia de esteroides se confirmó que todos los aislamientos correspondieron a micoplasmas (Tabla 1).

4.5 RESULTADOS DE LAS MUESTRAS PROBLEMA:

En las Pruebas de Inhibición de crecimiento (IC) y Dependencia de esteroides, IFD e

Tabla 1. Resultados de los controles pulmonares y cepas de referencia en las pruebas de Inhibición del crecimiento y Dependencia de esteroides (sobre agar).

Pruebas	Controles					
	Muestras pulmonares			Cepas de referencia		
	Negativo *	Positivo1	Positivo2	M. h.	M. f.	M. hr.
Inhibición del crecimiento:						
Suero anti M. h.	-	+	+	+	-	-
Suero anti M. f.	-	-	-	-	+	-
Suero anti M. hr.	-	-	-	-	-	+
Dependencia de esteroides	-	+	+	+	+	+

* No se aisló microorganismo alguno.

Donde M. *hyopneumoniae*=M.h., M. *flocculare*=M.f. y M. *hyorhinis*=M.hr.

IPI se muestran en las Tablas 2 y 3.

De un total de 56 muestras, en 45 se obtuvo crecimiento característico (al del micoplasma), mismas que fueron positivas a la prueba de dependencia de esteroides. En la prueba de IC, 41 fueron positivas (tomando en cuenta los datos de acuerdo a que a fueran o no positivo a *M. hyopneumoniae*, por medio del antisuero correspondiente) y 15 fueron negativas; dentro de éstas últimas cuatro fueron positivas a *M. hyorhinis* pero clasificadas como negativas según lo antes mencionado y de las restantes no se obtuvo crecimiento de ningún microorganismo.

En la prueba de IF, fueron positivas las laminillas en las que se observó un aglomerado de color amarillo-limón a la luz del bronquio (Figura 2). Fueron negativas las preparaciones en las que no se observó ningún tipo de fluorescencia. De cada uno de los cortes, se observó otro seriado al teñido con el fin de detectar fluorescencia inespecífica y que en ninguno de ellos se presentó. Los controles negativos no presentaron fluorescencia al contacto con el conjugado.

En la lectura de la prueba de IPI, el resultado dependió de la presencia de precipitado de color café-marrón en la preparación. En general, se observó el precipitado sobre las estructuras celulares (cilios y células) a la luz del bronquio; en algunos casos no se apreciaron los cilios pero se observó al micoplasma adherido a la superficie de las células epiteliales. Fuera de esta zona no se observó precipitado alguno (Figuras 3 y 4).

En las pruebas de IC, IF e IPI, los resultados de 50 muestras fueron similares, siendo 38 positivas, 12 negativas y 6 en las que alguno de los resultados no coincidían con los otros (Tabla 4).

Tabla 2. Resultados de cada una de las muestras con las pruebas de Inhibición del Crecimiento (IC), Inmunofluorescencia Directa (IFD) e Inmunoperoxidasa Indirecta (IPI) de las 56 muestras problema.

Muestra	IC	IFD	IPI	Muestra	IC	IFD	IPI
Control -	-	-	-	27	+	+	+
Control 1+	+	+	+	28	+	-	-
Control 2+	+	+	+	29	+	+	+
				30	+	+	+
1	+	+	+	31	+	+	+
2	+	+	+	32	+	-	+
3	-	-	-	33	+	+	+
4	-	-	-	34	+	+	+
5	+	+	+	35	+	+	+
6	+	+	+	36	-	-	-
7	-	-	-	37	+	+	+
8	-	-	-	38	+	+	+
9	+	-	+	39	+	+	+
10	+	+	+	40	+	+	+
11	-	-	-	41	+	+	+
12	-	-	+	42	+	+	+
13	-	-	-	43	+	+	+
14	+	+	+	44**	-	-	-
15	+	+	+	45	+	+	+
16	+	+	+	46	+	+	+
17	+	+	+	47	+	+	+
18	+	+	+	48	+	+	+
19	+	+	+	49	+	+	+
20	-	-	-	50	+	+	+
21	-	-	-	51	+	+	+
22	+	+	+	52*	-	-	+
23	+	+	+	53*	-	-	+
24	+	+	+	54*	-	-	-
25	-	-	-	55	+	+	+
26	+	+	+	56	+	+	+

* Muestras de pulmones de cerdos infectados experimentalmente con *M. hyorhinis*.

** Muestra de campo con *M. hyorhinis*.

Tabla 3. Resumen de resultados de las 56 muestras problema en las pruebas de la Inhibición del Crecimiento (IC), Inmunofluorescencia Directa (IFD) e Inmunoperoxidasa Indirecta (IPI).

PRUEBAS	CONTROLES			MUESTRAS			
	Negativo	Positivo 1	Positivo 2	Positivas		Negativas	
				No.	%	No.	%
IC	-	+	+	41	73.2	15	26.8
IFD	-	+	+	38	67.8	18	32.2
IPI	-	+	+	43	76.7	13	23.3

Los signos - y + son negativo y positivo respectivamente.

No: Es el número de individuos por resultado en la prueba.

%; Es el porcentaje con respecto al total de 56 muestras en cada resultado.



Figura 2. Reacción positiva de Inmunofluorescencia Directa sobre un corte histológico de un bronquio de pulmón de cerdo infectado con *M. hyopneumoniae*. Se observa la fluorescencia en la luz del bronquio (40x).



Figura 3. Reacción positiva de Inmunoperoxidasa Indirecta sobre un corte histológico de un bronquio de pulmón de cerdo infectado con *M. hyopneumoniae*(40X). La precipitación café-marrón de la DAB se observa sobre los cilios y células del epitelio bronquial.



Figura 4. Corte de un bronquio de pulmón de cerdo infectado con *M. hyopneumoniae* con resultado negativo en la prueba de Inmunoperoxidasa Indirecta (40X). No se observa precipitado sobre la superficie del corte.

Tabla 4. Combinación de resultados de las 56 muestras en las pruebas de IC, IFD e IPI.

Combinación de resultados		Pruebas		
No. de muestras	%	IC	IFD	IPI
38	67.85	+	+	+
12	21.42	-	-	-
3	5.35	-	-	+
2	3.57	+	-	+
1	1.78	+	-	-

4.6 EVALUACIONES DE LAS PRUEBAS:

Sensibilidad y especificidad de las pruebas de IPI e IFD:

La sensibilidad y la especificidad de las pruebas de IPI e IFD se muestran en las Tablas 5 y 6 respectivamente.

Tabla 5. Obtención de Sensibilidad y Especificidad de la Prueba de Inmunoperoxidasa Indirecta:

		Prueba de Inmunoperoxidasa Indirecta	
		Muestras Positivas a la prueba	Muestras Negativas a la prueba
Enfermedad	Presente	40	1
	Ausente	3	12

Sensibilidad : $(40 / 41) 100 = 97.56 \%$
 Especificidad : $(12 / 15) 100 = 80.00 \%$
 Valor predictivo Positivo : $(40 / 43) 100 = 93.02 \%$
 Valor predictivo Negativo : $(12 / 13) 100 = 92.30 \%$
 Eficacia de la prueba : $(52 / 56) 100 = 92.85 \%$

Tabla 6. Obtención de Sensibilidad y Especificidad de la Prueba de Inmunofluorescencia Directa:

		Prueba de Inmunofluorescencia Directa	
		Muestras Positivas a la prueba	Muestras Negativas a la prueba
Enfermedad	Presente	38	3
	Ausente	0	15

Sensibilidad : $(38 / 41) 100 = 92.68 \%$
 Especificidad : $(15 / 15) 100 = 100.00 \%$
 Valor predictivo Positivo : $(38 / 38) 100 = 100.00 \%$
 Valor predictivo Negativo : $(15 / 18) 100 = 83.33 \%$
 Eficacia de la prueba : $(53 / 56) 100 = 94.64 \%$

V DISCUSION

En este trabajo se aisló e identificó a los micoplasmas con la prueba de dependencia de esteroides (usando la solución de digitonina, secuestrador de esteroides) con la que se descartó que el microorganismo aislado fuera un *Acholeplasma*, y como las pruebas se efectuaron en una atmósfera de 5 a 12% de oxígeno se presume que el crecimiento de *Anaeroplasmas* fue inhibido, dado que estos son anaerobios estrictos. El crecimiento de *Spiroplasma* se descarta tomando en cuenta que parasitan solo plantas (Cuadro 1). No obstante se comprobó que ninguna otra clase de microorganismo fuera aislado (hongo o bacteria) (25, 27, 42, 52).

Así, la población de individuos enfermos o infectados con *M. h.* la formaron aquellos animales que al momento de sacrificarlos presentaron signos y lesiones pulmonares que caracterizan a la enfermedad, de los que el micoplasma fue aislado y que fueron positivos a la prueba de IC, asegurando de esta forma que la enfermedad estaba presente, incrementando la probabilidad de aislarlo y disminuyendo la de que un falso negativo se presentara. Y como animales sanos, se consideraron a aquellos que no cumplieron con alguna de las evaluaciones, esto es, los que aun habiendo tenido signos no presentaron daños en el pulmón, de los que no se aisló *M. h.*, o los que fueron negativos a la prueba de IC. Cabe destacar que los pulmones que presentaban patología muy drástica fueron desechados ya que por lo general se encontraban presentes otros microorganismos que enmascaraban la presencia del micoplasma haciendo imposible su aislamiento (8, 42, 59).

Por lo tanto, al grupo de animales con N. E. lo formaron 41 muestras positivas y al de animales sanos o libres de N. E. lo constituyeron 15 muestras entre las que se encontraban cuatro infectadas con *M. hr.*, de las cuales una era de campo y las otras tres pertenecieron a cerdos infectados con *M. hr.* cepa ATCC, que

formaron parte de otro trabajo experimental y que se trabajaron como muestras en ciego (38). Las poblaciones se manejaron en términos de la última prueba de evaluación y que corresponde a la de IC.

Se consideró como presente la enfermedad cuando cumplió con la evaluación descrita arriba y ausente cuando no cumplió con dichos requisitos para efecto de la determinación de sensibilidad y especificidad.

Entre la prueba de IC y las pruebas de IFD e IPI existió una diferencia de 10.73% y coinciden en un 89.27%, considerando los porcentajes de positivos y negativos obtenidos en cada una de ellas (Tabla 4).

De la comparación de los resultados de la prueba de IPI con la de las poblaciones, se obtuvo para la prueba de IPI una sensibilidad de 97.56% y una especificidad igual a 80.00%, con una eficacia de 92.85%; se presentaron 3 resultados falsos-positivos, dos de los cuales corresponden a muestras infectadas con *M. hr.* y una a un pulmón sano (Tabla 2), estos resultados se atribuyen a la presencia de anticuerpos que cruzan inespecíficamente contenidos en el suero (ya que los controles en los que se usaron el conjugado y la solución reveladora sobre tejidos de las muestras, no dieron coloración –Figura 4). En el caso del pulmón sano, en particular, no se descarta que el *M. h.* estaba presente en el tejido pulmonar, esto es, el cerdo del que provenía la muestra presentó los signos de la enfermedad y el daño en el pulmón, pero el aislamiento fue negativo, la prueba de IC no se realizó y se consideró libre de *N. E.*; posiblemente el micoplasma estaba presente aunque en baja cantidad como para ser aislado y no obstante se detectó en dos de tres ocasiones en que se evaluó la muestra en la que se presentó esta situación. En este último punto, las pruebas inmunohistoquímicas tienen la ventaja, que el micoplasma no se pierde en el proceso y queda expuesto haciendo su identificación más sencilla (14, 25).

Con respecto a las muestras infectadas con *M. hr.* y positivas a IPI, los resultados denotan que existen cruza antigénica entre ambos micoplasmas, haciendo necesaria una purificación del suero (el cruce antigénico se presentó sólo en 2 de 4 muestras). A excepción de estas muestras, en las demás se obtuvo para cada una de ellas, resultados semejantes en los tres eventos en los que se realizó la prueba, haciendo de ella un método confiable pues sus resultados son reproducibles y semejantes entre sí.

Ahora bien, al comparar los resultados de la prueba de IFD con los de la prueba de IC, se observa que tiende a dar falsos negativos ya que da 18 negativos contra 15 verdaderos sanos (Tabla 5), y no cruza con el *M. hr.* ni con otras estructuras en comparación a la prueba de IPI (Tabla 2), obteniéndose una sensibilidad del 92.68%, una especificidad de 100.00% y una eficacia igual a 94.64%.

Las diferencias de resultados entre las dos pruebas que se reflejan en la sensibilidad y especificidad que de cada una se obtuvo se atribuye a la pureza de los anticuerpos utilizados. En el caso de IFD se utilizó un conjugado que se obtuvo inoculando a cerdos con un antígeno Tween 20 semipurificado con Sephacryl S-300 y el antisuero a su vez fue purificado con DEAE-celulosa; mientras que para la prueba de IPI se inoculó a los conejos con el antígeno completo (cepa 194 de *M. h.*) y en la prueba se utilizó el suero policlonal (37, 46).

Se considera que el suero elegido fue adecuado pues fue de buena calidad ya que sin ser purificado, la prueba tuvo una sensibilidad y especificidad aceptables y su rendimiento fue bueno (por la dilución a la que se utilizó). Sin embargo, es evidente la necesidad de purificarlo; para ello han sido propuestos varios métodos entre los que destacan los que enfrentan los antisueros a cepas de *Escherichia coli* pues elimina los anticuerpos inespecíficos y cuyos procedimientos no son muy costosos, con lo que se favorecería el desarrollo y la difusión de la

prueba sin alterar, en gran medida, su costo. Por su parte, el protocolo que se siguió para la obtención de los antisueros al parecer es consistente dado que los tres sueros obtuvieron un título semejante entre ellos (17, 50, 54).

Cabe mencionar que el suero utilizado en la prueba de IPI fue evaluado ante las tres cepas de referencia con la prueba de IC (la cual se basa en la acción física que ejercen los anticuerpos al adherirse a sus respectivos antígenos en la membrana del micoplasma impidiendo su división) donde solo identificó a la cepa del *M. h.* con un diámetro de 5 mm y al no presentar reacción cruzada con las otras dos, se considera que el antisuero era muy afín al *M. h.*, disminuyendo el que un falso positivo se presentara al identificar las muestras.

En estudios donde se evaluaron y compararon pruebas como el aislamiento, IC, IF e IP, las más favorecidas han sido las de IF e IP. Sin embargo, entre las pruebas de IF e IP (en cualquiera de sus variedades) es por la última por la que se han inclinado varios autores (3, 14, 16, 25, 26, 28, 39, 42, 52), pues además de que se obtuvieron resultados semejantes entre ambas pruebas, las de IP son prácticas y versátiles, ya que pueden emplearse en ellas cortes congelados o embebidos en parafina, su desarrollo consta de pocos pasos, las laminillas resultantes pueden leerse en un microscopio óptico y pueden conservarse fijadas en resinas (tinción permanente); además, permiten observar a un tiempo la ubicación del elemento en estudio y el de las estructuras que lo rodean, obteniéndose un panorama más amplio de la relación entre ellos; mientras que para las pruebas de IF es necesario leer las preparaciones con un microscopio de luz U. V. y no pueden conservarse dado que la emisión de luz fluorescente se debilita con el paso del tiempo. En un par de estudios (28, 52) indican que la prueba de IPI es igual de específica que la prueba de IC y más que la de IF, pero que estas son menos sensibles que la de IPI. La diferencia de los valores que en este trabajo se determinaron se atribuyen, como ya se mencionó, al tipo de anticuerpos que se utilizaron en cada caso.

En este estudio, al igual que los antes citados, se observó la diferencia entre las dos pruebas, sobresaliendo la desarrollada, no obstante el menor tiempo de realización de la prueba de IFD. La característica que sobresale en la tinción, es que se puede observar la ubicación y relación entre las estructuras celulares y el micoplasma, el que se localizó en los bronquios sobre los cilios de las células epiteliales, lo que también se observó en otro estudio bajo otra técnica de inmunoperoxidasa indirecta (14); mientras que en la prueba de IF solo se observaron los agregados de isotiocianato de fluoresceína sobre el área de los cilios sin poder observar las otras estructuras del tejido (Figuras 2 y 3).

Varios autores mencionan que la prueba de IPI es equivalente a otras variantes de inmunoperoxidasa (puente enzimático, peroxidasa-antiperoxidasa y sistema avidina-biotina) dado que los resultados entre ellas son semejantes, principalmente en la identificación del antígeno en estudio y la amplificación de la reacción final y que sin embargo, la de IPI es más económica y sencilla pues como no involucra los reactivos de laboriosa composición de aquellas disminuye su costo y en algunos casos, los pasos en su montaje; en el mismo sentido, señalan a la prueba de Inmunoperoxidasa Indirecta como una opción adecuada en el diagnóstico de Neumonía Enzoótica (10, 13, 16, 27).

Para redondear más este estudio se recomienda evaluar la prueba bajo un protocolo más amplio y elaborado, donde se pueda ver el comportamiento de la prueba tanto en los diferentes estadios de la enfermedad, como en animales sanos y enfermos crónicos, y de esa forma ampliar las especificaciones de la prueba.

Así, por las ventajas que presenta la prueba de IPI ante IFI, IC y aislamiento (que fueron las que se evaluaron en este trabajo) puede ser una buena opción como prueba diagnóstica de la N. E. pues reduce tiempo y material invertido en ello (comparándola con las pruebas citadas), sin embargo no se propone como

única prueba para diagnosticarla, pues de acuerdo a otros estudios y a éste mismo, se ve la necesidad de utilizar más de una prueba para evaluar diferentes parámetros de la enfermedad y así poder obtener resultados que concuerden con los datos que de cada uno de los estudios se tienen para la enfermedad y de ésta manera diagnosticarla adecuadamente (10, 27, 42).

VI CONCLUSIONES

A) Las pruebas IPI e IFD, para detectar al *Mycoplasma hyopneumoniae* en pulmón de cerdo, arrojan resultados semejantes, sin embargo la prueba de IPI es mas ventajosa en el sentido de la observación de la preparación final dadas las características que presenta cada una (apreciación de la morfología, la observación de la preparación en el microscópio óptico, la conservación de la muestras).

B) En la prueba de Inmunoperoxidasa Indirecta se obtuvo una sensibilidad de 97.56%, una especificidad de 80.00%, con una eficacia de 92.85%, ésta última superior a la obtenida de la prueba de IFD.

D) Dado que en los resultados de las pruebas IC, IFD e IPI) para detectar al micoplasma en cada una de las muestras existieron pocas diferencias, se propone a la IPI como una prueba alternativa en el diagnóstico de la Neumonía Enzoótica.

E) Para mejorar la eficiencia de la prueba es recomendable la purificación del suero hiperinmune contra el *Mycoplasma hyopneumoniae*. Por otro lado, para que esta prueba pueda ser utilizada con fines comerciales sería mejor primero encontrar un antígeno específico del micoplasma, producir por un método adecuado anticuerpos específicos hacia el y con ellos estandarizar la técnica.

VII ANEXO

7.1 Anexo 1. Procedencia de los sueros de conejo.

Esta titulación fue el seguimiento de una inmunización hecha en un proyecto anterior, con el objeto de identificar cual de los sueros empleados tenía un título mayor de anticuerpos contra *M. hyopneumoniae* y emplearlo en la prueba de Inmunoperoxidasa Indirecta.

Así, los animales (3 conejos de raza Nueva Zelanda de aproximadamente 1.5 Kg de peso, que fueron proporcionados por el Módulo de Conejos del Centro de Enseñanza Agropecuaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán; U.N.A.M. y seronegativos a *M. hyopneumoniae*, *M. flocculare*, *M. hyorhinis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y a *Pasteurella multocida*); fueron inoculados bajo el protocolo de inmunización propuesto por Pijoan (1973). Los sueros se titularon por medio de la técnica de ELISA indirecta utilizando el antígeno Tween 20 de la cepa 194 de *M. hyopneumoniae* y un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (a una dilución de 1:2500).

El promedio del título de anticuerpos de cada uno de los sueros fue de 1:2046 y el protocolo que se siguió consistió en aplicar por cuatro semanas consecutivas cantidades ascendentes de 1 a 5 ml de antígeno vía intramuscular, se les dejó descansar 2 semanas y se les aplicó 5 ml de antígeno vía intramuscular, después de 4 días se sacrificó al conejo (50).

7.2 Anexo 2. Medio de Cultivo de Friis modificado (53, 66):

Ingredientes y preparación de estos:

Solución de Hanks' (pH 7.4):

CaCl ₂	1.4 g
KCl	4.0 g
KH ₂ PO ₄	0.6 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0 g
NaCl	80.0 g
Na ₂ HPO ₄	9.0 g
Glucosa	10.0 g
Agua destilada c.b.p.	1000.0 ml

Se ajustó el pH, se llevó a volumen y se esterilizó por filtración.

Extracto fresco de levadura:

Se disolvieron barras de levadura fresca a una temperatura entre 80 y 87 °C durante 30 min en un amortiguador isotónico de fosfatos (PBS) pH 7.2-7.4, 0.1 M a una concentración final de 20%. Una vez disuelta la levadura, se centrifugó a 5000 x g por 20 min, se filtró con cartuchos de decreciente porosidad (de 0.45 y de 0.22 μ de porosidad) y se esterilizó en un cartucho de 0.22 μ de tamaño de poro y se conservó a -20 °C.

Suero caprino:

Extraída la sangre y una vez contraído el coágulo (24 hrs después de la extracción) el suero se centrifugó a 5000 x g por 10 min. Posteriormente, se inactivó a 56 °C/30 min y esterilizó por filtración en un cartucho de 0.22 μ de porosidad (se prefiltró en cartuchos en decreciente porosidad).

Solución de rojo de fenol 0.20%:

Se disolvieron 0.20 mg en 100 ml de agua destilada. Se agregó etanol en cantidad mínima para su disolución total.

Solución de lactoalbúmina y DNA:

Se disolvió la cantidad adecuada, se disolvieron en solución de Hanks y se

esterilizó por filtración.

Composición del Medio de Friis, pH 7.4 - 7.5:

Solución de Hanks, pH 7.4	304.0 ml
Extracto de levadura al 20% en PBS pH 7.2-7.4, 0.1 M	18.0 ml
Suero caprino	18.0 ml
Infusión cerebro corazón	4.0 g
PPLO	5.0 g
Lactoalbúmina	2.0 g
Rojo de fenol al 0.20%	7.0 ml
DNA	0.1 g
Agar purificado	10.0 g**
Agua destilada c.b.p.	1000.0 ml

Preparación del medio:

Líquido: Se mezcló la infusión de cerebro-corazón, el PPLO, la solución de rojo de fenol y el agua destilada, se ajustaba el pH con NaOH y se esterilizó en autoclave a 121 °C/15 min. La solución de Hanks, la lactoalbúmina y el DNA, el suero caprino y el extracto de levadura se mezclaron (en condiciones de esterilidad) con la solución anterior, una vez que aquella tuviera una temperatura soportable al tacto. El medio se sirvió en tubos de cultivo, se les sometió a prueba de esterilidad y se conservó a 4 °C.

Sólido: En este caso se tomó la cantidad de agar** necesario y se colocó con los ingredientes que se esterilizaban en autoclave, integrándole posteriormente, los demás componentes de la forma antes descrita. El medio se sirvió en cajas de cultivo, se sometió a prueba de esterilidad y se conservó a 4 °C.

7.3 Anexo 3. Sensibilidad y Especificidad (11, 18, 24, 35).

		Prueba	
		No. de Muestras Positivas	No. de Muestras Negativas
Enfermedad	No. de individuos Con enfermedad	A	B
	No. de individuos Sin enfermedad	C	D

Donde: A = número de individuos enfermos clasificados correctamente por la prueba o verdaderos enfermos; B = número de individuos enfermos mal clasificados por la prueba o falsos sanos; C = número de individuos sin la enfermedad mal clasificados por la prueba o falsos enfermos y D = número de individuos sin la enfermedad correctamente clasificados por la prueba o verdaderos sanos.

Sensibilidad: $(A/A+B) \times 100$

Especificidad: $(D/C+D) \times 100$

Valor predictivo Positivo: $(A/A+C) \times 100$

Valor predictivo Negativo: $(D/B+D) \times 100$

Eficacia de la prueba: $(A+D) / (A+B+C+D) \times 100$

VIII REFERENCIAS

1. Amass, S. F., Clark, L. K., Van Alstine, W., Bowersock, T. L., Murphy, D., Knox, K. and Albregts S. (1994). Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida* infections in swine. J. Am. Vet. Med. Assoc. Jan. 1; 204(1): 102-107.
2. Armstrong, C. H., Freeman, M. J., Sands-Freeman, L., López-Osuna, M.; Young, T. and Runnels L. (1983). Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay and the indirect hemagglutination and complement fixation tests for detecting antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. Can. J. Comp. Med. Oct; 47(4): 464-70.
3. Armstrong, C. H., Scheidt, A. B., Thacker, H., Runnels, I. and Freeman, M. (1984). Evaluation of criteria for the postmortem diagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine. Can. J. Comp. Med. Jul; 48(3): 278-81.
4. Baskerville A., et al. (1972). Development of the early lesions in experimental enzootic pneumonia of pigs: an ultrastructural and histological study. Res. Vet. Sci. 13: 570-578.
5. Bereiter, M., Young, T. F., Joo, H. S. and Ross, R. F. (1990). Evaluation of the ELISA and comparison to the complement fixation test and radial immunodiffusion enzyme assay for detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine serum. Vet. Microbiology. Nov; 25(2-3): 177-92.
6. Biberstein, E. (1990). The respiratory tract as a microbial habitat. En: Review of veterinary microbiology. Biberstein, E. and Zee, Y. Blackwell Scientific Publications. USA. pp 146-149.
7. Ciprian, A., Pijoan, C., Cruz, T., Camacho, J., Tortora, J. and De la Garza, M. (1988). *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. Can. J. Vet. Res. 52: 436-438 .

8. Ciprian, A., Cruz, T. A. and De-la-Garza M. (1994). *Mycoplasma hyopneumoniae*: interaction with other agents in pigs, and evaluation of immunogens. Arch. Med. Res. Summer; 25(2): 235-239
9. Chen, J. W., Zhang, L., Song, J., Hwang, F., Dong, Q. and Liu, J. (1992). Comparative analysis of glycoprotein and glycolipid composition of virulent and avirulent strain membranes of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Current. Microbiology, 24: 189-192.
10. Davidson, M., Lindsey, J. R., Brown, M. and Schoeb, T. (1981). Comparison of methods for detection of *Mycoplasma pulmonis* in experimentally and naturally infected rats. J. Clin. Microbiol. Dec. 14(6): 646-655.
11. Dawson-Saunders, B. and Trap, R. (1993). Bioestadística Médica. Edit. El manual moderno. México. pp 172-177.
12. DeBey, M. C., Jacobson, C. D. and Ross, R. F. (1992). Histochemical and morphologic changes of porcine airway epithelial cells in response to infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Am. J. Vet. Res. Sep; 53(9): 1705-10.
13. DeLellis, R. A., Sternberger L. A., Mann, R., Banks, P. and Nakane, P. (1979). Immunoperoxidase technics in diagnostic pathology. Am. J. Clin. Pathol. 71(5): 483-488.
14. Doster, A. R. and Lin, B. C. (1988). Identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* in formalin-fixed porcine lung, using an indirect immunoperoxidase method. Am. J. Vet. Res. Oct; 49(10): 1719-21.
15. Etheridge, J. R. and Lloyd, L. C. (1980). A complement-fixation test for enzootic pneumonia of pigs using a complement dilution method. Aust Vet. J. Mar; 56(3): 101-5.
16. Falks, K., Hoie, S. and Lium, B. M. (1991). An abattoir survey of pneumonia and pleuritis in slaughter weight swine from 9 selected herds. Acta. Vet. Scand. 32(1): 67-77.
17. Feld, N. C., Quist, P., Ahrens, P., Friis, N. and Meyling, A. (1992). A monoclonal blocking ELISA testing serum antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*.

- Vet. Microbiology. Jan; 30(1): 35-46.
18. Fletcher, R. H. (1998). *Epidemiologia Clínica*. Segunda Edic. Edit. Masson-Williams and Wilkins. España. pp 43,59,75-79,83.
 19. Freeman, M. J., Armstrong, C. H., Sands-Freeman, L. and López-Osuna, M. (1984). Serological cross-reactivity of porcine reference antisera to *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. flocculare*, *M. hyorhinis* and *M. hyosynoviae* indicated by the enzyme-linked immunosorbent assay, complement fixation and indirect hemagglutination tests. *Can. J. Comp. Med.* Apr; 48(2): 202-207.
 20. Gay, H. and Docherty, J. (1986). Immunoperoxidase detection of viral antigens in cells. En: *Clinical Virology Manual*. Specter & Stevens. Elsevier. U. S. A. pp 147-157.
 21. Geary, S. J. and Walczak, E. M. (1985). Isolation of cytopathic factor from *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Infect. Immun.* 48: 576-8.
 22. Gois, M., Kuksa, F. and Sisak, F. (1977). Experimental infection of gnotobiotic piglets with *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Bordetella bronchiseptica*: *Zentralbl. Veterinaermed. Reihe B.* 24: 89-96.
 23. Hannan, P., Banks, R., Bhogal, B., Blanchflower, S., Donald, A., Fish, J. and Smith, D. (1984). Reproducible pneumonia in gnotobiotic piglets induced with broth cultures of *Mycoplasma hyopneumoniae* and the effect of animal passage on virulence. *Res. Vet. Sci.* 36: 153-163.
 24. Henry, J. B. (1992). *Diagnóstico y tratamiento clínico para el laboratorio* Novena Edic. Edit. SALVAT. México, pp 54-58, 887-890, 895-900.
 25. Hill, A. C. (1978). Demonstration of mycoplasmas in tissue by the immunoperoxidase technique. *J. Infect. Dis.* Feb. 137(2):152-154.
 26. Hsu, S. and Ree, H. J. (1980). Self-sandwich method. *Am. J. Clin. Pathol.* 47(1): 32-40.
 27. Hsu, S., Raine, L. and Fanger, H. (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. *J. Histochemistry and cytochemistry.* 29(4): 577-580.

28. Imada, Y., Uchida, I. and Hashimoto, K. (1987). Rapid identification of mycoplasmas by indirect immunoperoxidase test using small square filter paper. *J. Clin. Microbiol.* Jan; 25(1): 17-21.
29. Intraraksa, Y., Engen, R. L. and Switzer, W. P. (1984). Pulmonary and hematologic changes in swine with *Mycoplasma hyopneumoniae* pneumonia. *Am. J. Vet. Res* March; 45(3): 474-7.
30. Jericho, K. W. F. (1986). Pathogenesis of mycoplasma pneumonia of swine. *Can. J. Vet. Res.* 50: 136-137.
31. Kishima, M., Ross, R. F. and Kuniyasu, C. (1985). Cell-mediated and humoral immune response to *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs enhanced by dextran sulfate. *Am. J. Vet. Res.* February, 46(2): 456-462.
32. Kishima, M. and Ross, R. F. (1985). Suppressive effect of nonviable *Mycoplasma hyopneumoniae* on phytohemagglutinin-induced transformation of swine lymphocytes. *Am. J. Vet. Res.* 46(11): 2366-2368.
33. Kobisch, M., Quillien, L., Tillon, J. and Wróblewski, H. (1987). The *Mycoplasma hyopneumoniae* plasma membrane as a vaccine against porcine enzootic pneumonia. *Ann. Inst. Pasteur. Immunol.* Sep-Oct; 138(5): 693-705.
34. Kristensen, B., Paroz, Ph., Nicolet, J., Wanner, M. and De Weck, A. (1981). Cell-mediated and humoral immune response in swine after vaccination and natural infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.* 42(5): 784-788.
35. Krupp, M., Schroder, S., Tierney, L., McPhee, S., Papadakis, M. (1993). *Diagnóstico Clínico y Tratamiento*. Edif. El Manual Moderno. México. pp 11-15.
36. Kurman, R. J. and Casey, C. (1984). Técnicas de inmunoperoxidasa en patología quirúrgica: principios y métodos. En: *El laboratorio de inmunología clínica*. Segunda Edic. Rose, N. and Friedman, H. Edif. Médica Panamericana. Argentina. pp. 97-106.
37. Lara, P., Cruz, S., Mendoza, E., Colmenares, U. y Ciprián, C. (1995). Evaluación de un conjugado de Inmunofluorescencia (BEEN-EK)

- desarrollado en la FES-Cuautitlán, para el diagnóstico de la Neumonía Enzoótica. X Congreso Nacional de médicos veterinarios especialistas en cerdos. Manzanillo, Colima. México. pp. 54-55.
38. Lara, P., Torres, M. E., Sánchez, A., Tortora, J., Cruz, S., Hernández, E., Mendoza, E. y Ciprián, C. (1996). Estudio de la interacción entre *Mycoplasma hyopneumoniae* y/o *Mycoplasma hyorhinis* y/o *Hemophilus parasuis* en cerdos convencionales. Memorias de la Reunión de investigaciones pecuarias. Morelos, México. pp. 111.
 39. Lynch, M., Raphael, S., Meller, L., Spare, P. and Inwood, M. (1985). Métodos de Laboratorio. Segunda Edic. Nueva Edit. Interamericana. México. pp 1300-1310.
 40. Lloyd, L. C., Badman, R. T., Etheridge, J., McKechnie, K. and Iyer, H. (1984). Assessment of a complement fixation test to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. Aust. Vet. J. Jul; 61(7): 216-218.
 41. Masseyeff, R. F., Albert, W. H. and Staines, N. A. (1993). Methods of Immunological analysis. Vol 3. Cells and Tissues. Rep. Fed. of Germany. pp 148-341.
 42. McKean, J. D., Andrews, J. J. and Farrington, D. O. (1979). Evaluation of diagnostic procedures for detection of mycoplasmal pneumonia of swine. J. Am. Vet. Med. Assoc. Jan. 15; 174(2): 177-80.
 43. Messier, S., Ross, R. F. and Paul, P. S. (1990). Humoral and cellular immune responses of pigs inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Am. J. Vet. Res. Jan; 51(1): 52-8.
 44. Messier, S. and Ross, R. F. (1991). Interactions of *Mycoplasma hyopneumoniae* membranes with porcine lymphocytes. Am. J. Vet. Res. September, 52 (9): 1497-1502.
 45. Morrison, R. B., Pijoan, C., Hillel, H. and Rapp, V. (1985). Microorganisms associated with pneumonia in slaughter weight swine. Can. J. Comp. Med: 49: 129-137.
 46. Nicolet, J., Paroz, P. and Bruggmann, S. (1980). Tween 20 soluble proteins of

- Mycoplasma hyopneumoniae* as antigen for an enzyme linked immunosorbent assay. Res. Vet. Sci. Nov; 29(3): 305-9.
47. Pérez, M., Suárez, G. y Flores, C. (1990). Bacteriología General, principios químico-biológicos. Editorial UNAM. México. pp 3-21.
 48. Piffer, I. A. and Ross, R. F. (1984). Effect of age on susceptibility of pigs to *Mycoplasma hyopneumoniae* pneumonia. Am. J. Vet. Res. March; 45(3): 478-81.
 49. Piffer, I. A., Young, T. F., et al. (1984). Comparison of complement fixation test and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of early infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Am. J. Vet. Res. Jun; 45(6): 1122-1126.
 50. Pijoan. (1973). Studies of Mycoplasmas in relation to porcine respiratory diseases. Ph. D. Thesis. University of Surrey, England.
 51. Pointon, A. M., Byrt, D. and Heap, P. (1985). Effect of enzootic pneumonia of pigs on growth performance. Aust. Vet. J. Jan; 62(1): 13-8.
 52. Polak-Vogelzang, A. A., Hagenars, R. and Nagel. (1978). Evaluation of an indirect immunoperoxidase test for identification of acholeplasma and mycoplasma. J. Gen. Microbiol. Jun. 106: 241-249.
 53. Quinn, P. J. and Carter, M. E. (1994). Clinical veterinary microbiology. Wolfe: USA. pp 320-326.
 54. Ro, L., Chen, R. and Shivan, D. (1994). Rapid purification of antiserum against *Mycoplasma hyopneumoniae* by an efficient absorption method. J. Biochem. Biophysical Methods. 28: 155-159.
 55. Ross, R. F. (1992). Mycoplasmal Diseases. En: Diseases of swine. Leman. Seventh Edition. A. D. and Straw, B. E. AMES. Iowa, U.S.A. pp 537-543.
 56. Sheldrake, R. F., Gardner, I. A., Saunders, M. and Romalis, L. (1990). Serum antibody response to *Mycoplasma hyopneumoniae* measured by enzyme-linked immunosorbent assay after experimental and natural infection of pigs. Aust. Vet. J. Feb; 67(2): 39-42.
 57. Sneath, P., Mair, N., Sharpe, M. and Holt, J. (1986). Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol 2. Edit. Williams & Wilkins. USA. pp 995-998.

58. Stemke, G. W., Phan, R., Young, T. and Ross, R. (1994). Differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma flocculare* and *Mycoplasma hyorhinis* on the basis of amplification of a 16s rRNA gene sequence. *Am. J. Vet. Res.* January, 55(1): 81-84.
59. Strasser, M., Abiven, P., Kobisch, M. and Nicolet, J. (1992). Immunologica and pathological reactions in piglets experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* and/or *Mycoplasma flocculare*. *Vetl Immunol. Immunopath.* 31: 141-153.
60. Straw, B. E., Tuovinen, V. K. and Bigras-Polin, M. (1989). Estimation of the cost of pneumonia in swine herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* Dec. 195(12): 1702-1706.
61. Tajima, M., Yagihashi, T. et al. (1982). Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* with the porcine respiratory epithelium as observed by electron microscopy. *Infect. Immun.* 37: 162-69.
62. Timoney, J. F. and Gillespie, J. (1988). *Hayan and Bruner's microbiology and infections diseases of domestic animal.* Octava Edic. Comstock Publishing Associates. USA. pp 304-305.
63. Tortora, G., Funke, B. and Case, C. (1992). *Microbiology, an Introduction* Fourth Edition. The Benjamin/Cumming Publishing Company, Inc. USA. pp 251-253.
64. Van Tail, L., Dohoo, I. R. and Morley, R. S. (1991). Epidemiological associations between *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* antibody titers and lung lesions in Prince Edward Island swine herds. *Can. J. Vet. Res.* 55: 347-351.
65. Voller, A., Bidwel, D. and Bartlett, A. (1984). Análisis por enzimas fijadas c inmunoabsorbentes. En: *El laboratorio en Inmunología Clínica.* Segunda Edic. Rose, N. and Friedman, H. Edit. Panamericana. Argentina. pp 414-426.
66. Whitford, H. W., Rosenbusch, R. F. and Laverman, L. H. (1994). *Mycoplasmosis in animals: laboratory diagnosis.* S. University Press. Ames. Iowa. pp 3-11, 12-30, 68-83.

67. Wood, A. K. and Lloyd, L. C. (1980). A radiological investigation of enzootic pneumonia in pig. *Res. Vet. Sci.* 29: 8-20.
68. Yamamoto, R. (1990). Mollicutes. *En: Review of veterinary microbiology.* Biberstein, E. L. and Zee, Y. Blackwell Scientific Publications. USA. pp 213-221.
69. Young, T. F., Erickson, B. Z., Ross, R. and Wannemuehler, Y. (1989). Hemagglutination and hemagglutination inhibition of turkey red blood cells with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.* Jul; 50(7): 1052-1055.
70. Zhang, Q., Young, T. F. and Ross, R. F. (1995). Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. *Infect. Immun.* Mar; 63(3): 1013-9.
71. Zielinski, G. C., Yung T., Ross R. F. and Rosenbusch, R. (1990). Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to cell monolayers. *Am. J. Vet. Res.* March, 51(3): 339-343.
72. Zielinski, G. C. and Ross, R. F. (1990). Effect of growth in cell cultures and strain on virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* for swine. *Am. J. Vet. Res.* March, 51(3): 344-348.
73. Zielinski, G. C. and Ross, R. F. (1993). Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine ciliated respiratory tract cells. *Am. J. Vet. Res.* Aug; 54(8): 1262-9.