

43



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

“CORRELACION ENTRE LAS PRUEBAS DE
INMUNOFLUORESCENCIA E INMUNOPEROXIDASA
DIRECTA PARA LA DETECCION DE *Mycoplasma
hyopneumoniae*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
BERENICE ROCIO GUTIERREZ BECERRIL

ASESORES: DR. TONATIUH A. CRUZ SANCHEZ.
DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO.

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO. 2001.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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
AUTÓNOMA DE MÉXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

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: 1a TESIS

"Correlación entre las pruebas de inmunofluorescencia
e inmunoperoxidasa directa para la detección de
Mycoplasma hyopneumoniae"
que presenta la pasante: Berenice Rocío Gutiérrez Becerri
con número de cuenta: 7807560-7 para obtener el título de:
Médica Veterinaria Zootecnista

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

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de Marzo de 2001.

PRESIDENTE	M.V.Z. José Rojo López	
VOCAL	M.V.Z. José Antonio Licea Vega	
SECRETARIO	Dr. Tonatiuh Cruz Sánchez	
PRIMER SUPLENTE	M.V.Z. Jorge Luis Rico Pérez	
SEGUNDO SUPLENTE	M.V.Z. Raúl Radillo Rodríguez	

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Enfermedades Respiratorias del Cerdo, de la Coordinación General de Investigación y Estudios de Posgrado, pertenecientes a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán; con el apoyo del proyecto PADEP 100001 bajo la dirección del Dr. Tonatiuh A. Cruz Sánchez y el Dr. Abel Ciprián Carrasco y la asesoría del M. en C. Edgar Aguilera Cerón.

DEDICATORIA

A DIOS:

Por permitirme coincidir
En este breve espacio de la vida
Con todas aquellas personas
Que han sido importantes
De alguna u otra manera
En mi formación.

A MI FAMILIA:

Mis padres

Por todas sus enseñanzas
Su apoyo incondicional
Y sus consejos.

Mis hermanas y hermanos

Que son un ejemplo a seguir.

Mis sobrinas y sobrinos

Por ser cada día mejores.

A **TODOS** MIS AMIGOS:

Presentes y ausentes †

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a las siguientes personas que me apoyaron en las diferentes etapas del desarrollo de este trabajo:

Mis asesores: Dr. Tonatiuh A. Cruz Sánchez, Dr. Abel Ciprián Carrasco por su apoyo e interés en la realización del presente trabajo.

M.V.Z. Victor Quintero Rodríguez, por proporcionarme las muestras pulmonares.

M. en C. Edgar Aguilera Cerón, por sus sugerencias y asesoría.

Dr. Eliseo Hernández Baumgarten, por permitirme hacer uso del microscopio electrónico del laboratorio de microscopía electrónica de la F.E.S.C. Campo 1.

Dra. Susana Mendoza Elvira, por las facilidades que proporcionó en el uso del equipo, reactivos y la donación de las cepas y los sueros de referencia utilizados en el trabajo.

M.V.Z. Angel Martínez Sosa, por la revisión del trabajo.

D.I. Jorge Gutiérrez Becerril, por su asesoría en computación y ayuda en la elaboración de las figuras.

A los miembros del Jurado: M.V.Z. José Rojo López, M.V.Z. Antonio Licea Vega, Dr. Tonatiuh Cruz Sánchez, M.V.Z. Jorge L. Rico Pérez, M.V.Z. Raúl Radillo Rodríguez, quienes dedicaron parte de su valioso tiempo en la revisión, corrección y en dar su opinión, con la finalidad del mejoramiento del presente trabajo.

También quiero agradecer a todos los profesores que a lo largo de la carrera contribuyeron en mi formación profesional.

INDICE GENERAL

	PAG.
I INDICE DE CUADROS	1
II INDICE DE FIGURAS	2
III RESUMEN	3
IV INTRODUCCION	4
V GENERALIDADES	7
5.1 Aparato respiratorio del cerdo	7
5.1.1 Mecanismos de defensa	7
5.1.1.1 Mecanismos de defensa inespecificos	7
5.1.1.2 Mecanismos de defensa especificos	9
5.2 Consideraciones generales de los micoplasmas	14
5.3 <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	20
5.3.1 Características generales	20
5.3.2 Cultivo y aislamiento	20
5.4 Neumonía Enzoótica Porcina	21
5.4.1 Definición	21
5.4.2 Antecedentes	21
5.4.3 Sinergia	22
5.4.4 Epizootiología	22
5.4.5 Patogénesis	23
5.4.6 Inmunidad	24
5.4.7 Signos clínicos	24
5.4.8 Lesiones	25
5.4.9 Diagnóstico	26
5.4.10 Diagnóstico diferencial	27
5.5 Prueba de inmunoperoxidasa directa	28
5.5.1 Antecedentes	28
VI OBJETIVOS	30
6.1 Justificación	30
6.2 Hipótesis	30
6.3 Objetivo general	30
6.4 Objetivos particulares	31
VII MATERIAL Y METODOS	33
7.1 Obtención de muestras pulmonares	33
7.2 Controles	33
7.3 Cultivo y aislamiento	33
7.4 Pruebas de identificación del Micoplasma	34
7.4.1 Prueba de dependencia de esteroles	34

7.4.2	Prueba de inhibición de crecimiento	34
7.4.2.1	Cepas de referencia	34
7.4.2.2	Sueros hiperinmunes	34
7.5	Prueba de inmunoperoxidasa directa	35
7.5.1	Titulación del conjugado	35
7.5.2	Procesamiento de las muestras	36
7.6	Prueba de inmunofluorescencia directa	37
7.6.1	Procesamiento de las muestras	37
7.7	Análisis estadístico	37
7.8	Determinación de sensibilidad y especificidad	37
VIII	RESULTADOS	39
8.1	Cultivo y aislamiento	39
8.2	Controles	39
8.3	Inmunofluorescencia directa	40
8.4	Inmunoperoxidasa directa	40
8.4.1	Titulación del conjugado	40
8.5	Análisis estadístico	45
8.6	Sensibilidad y especificidad	45
IX	DISCUSIÓN	48
X	CONCLUSIÓN	51
XI	ANEXOS	52
XII	GLOSARIO	55
XIII	BIBLIOGRAFIA	56

I INDICE DE CUADROS

	PAG.
Cuadro 1 Taxonomía y propiedades de los micoplasmas	17
Cuadro 2 Propiedades moleculares que distinguen a los mollicutes de otras eubacterias	18
Cuadro 3 Especies de micoplasmas patógenas	19
Cuadro 4 Controles utilizados en la titulación de la prueba de inmunoperoxidasa directa	36
Cuadro 5 Resultados de los controles pulmonares y cepas de referencia en las pruebas de inhibición de crecimiento y dependencia de esteroleos	39
Cuadro 6 Relación de resultados entre las pruebas de aislamiento, inhibición de crecimiento, inmunofluorescencia directa, e inmunoperoxidasa directa de las 56 muestras problema	41
Cuadro 7 Resultados de las pruebas de aislamiento, inhibición de crecimiento, inmunofluorescencia directa, e inmunoperoxidasa directa de las 56 muestras problema	42
Cuadro 8 Resultados de las pruebas de aislamiento, inhibición de crecimiento, inmunofluorescencia directa, e inmunoperoxidasa directa, resumen comparativo.	42
Cuadro 9 Tabla de contingencia 2X2 para determinar sensibilidad y especificidad de la prueba de inmunoperoxidasa directa	46
Cuadro 10 Tabla de contingencia 2X2 para determinar sensibilidad y especificidad de la prueba de inmunofluorescencia directa	47

II INDICE DE FIGURAS

	PAG.
Figura 1 Esquema inmunidad humoral	12
Figura 2 Esquema inmunidad celular	13
Figura 3 Diagrama general del experimento	32
Figura 4 Método inmunohistoquímico directo con anticuerpo marcado	38
Figura 5 Prueba de inmunofluorescencia directa, pulmón de cerdo, corte de 8 μ de grosor, control negativo (40x)	43
Figura 6 Prueba de inmunofluorescencia directa, pulmón de cerdo, corte de 8 μ de grosor , reacción positiva a la prueba (40x)	43
Figura 7 Prueba de inmunoperoxidasa directa, pulmón de cerdo, corte de 8 μ de grosor, reacción negativa a la prueba (10x)	44
Figura 8 Prueba de inmunoperoxidasa directa, pulmón de cerdo, corte de 8 μ de grosor, reacción positiva a la prueba (10x)	44
Figura 9 Prueba de inmunoperoxidasa directa, pulmón de cerdo, corte de 8 μ de grosor, reacción positiva a la prueba (40x)	44

III RESUMEN

El propósito de ésta investigación fué evaluar como método de diagnóstico la prueba de inmunoperoxidasa directa, comparada con inmunofluorescencia directa; el aislamiento de *Mycoplasma hyopneumoniae* y su identificación mediante la prueba de inhibición de crecimiento.

Para la realización de las pruebas se utilizaron muestras pulmonares de cerdos provenientes de diferentes granjas del país con problemas respiratorios, pertenecientes a lechones en etapa de destete que presentaban lesiones sugestivas de neumonía enzoótica.

Después de haber hecho una selección, se obtuvieron un total de 56 muestras de las cuales, 42 de éstas fueron positivas a la prueba de inmunoperoxidasa directa (IPD), y 14 negativas; al aislamiento del microorganismo (Aislam) y a la prueba de inhibición del crecimiento (IC), 41 fueron positivas y 15 negativas. En la prueba de inmunofluorescencia directa (IFD) 38 muestras fueron positivas y 18 fueron negativas

En la prueba de inmunofluorescencia directa así como en inmunoperoxidasa directa, se observó la localización del micoplasma a nivel del epitelio mucociliar bronquial, en el caso de IFD de color amarillo limón; en el caso de IPD los corpúsculos que se presentan a este nivel, de color café-rojizo.

Se obtuvo como resultado 100 % de sensibilidad y 93.33 % de especificidad para la prueba de inmunoperoxidasa directa, 92.68% de sensibilidad y 100% de especificidad para la prueba de inmunofluorescencia directa.

Al realizar el análisis estadístico, no se encontró diferencia en ambas pruebas (IPD e IFD) con respecto a Aislam e IC; se concluye que la prueba de inmunoperoxidasa directa es una buena alternativa para el diagnóstico de neumonía enzoótica porcina.

De estandarizarse la prueba, facilitaría el diagnóstico al evitar el uso del costoso equipo del microscopio de luz ultravioleta empleado en la prueba de inmunofluorescencia.

Ya que el diagnóstico de la neumonía enzoótica se puede dificultar en algunos casos, lo más recomendable es combinar diferentes métodos de diagnóstico.

Por lo que la prueba de inmunoperoxidasa viene a ser una alternativa diagnóstica en nuestro país donde se carece del diagnóstico de la neumonía enzoótica.

IV INTRODUCCIÓN

Los problemas respiratorios de los cerdos en general son cada vez más frecuentes en mayor o menor grado en todas las explotaciones y representan un factor limitante de la productividad. (72)

Las enfermedades respiratorias del cerdo tienen su efecto detrimental más serio durante las etapas finales del crecimiento, y su importancia está asociada con los sistemas intensivos de alojamiento, los cuales cambian la relación entre los microorganismos, el cerdo y su medio ambiente; la morbilidad y la mortalidad alcanzan los niveles más altos y por lo tanto un impacto económico considerable, debido a complejas interacciones entre varios factores como: temperatura, ventilación, humedad, construcciones, suministro de alimentos muy molidos, factores nutricionales, estado genético de los animales y contaminación de la atmósfera. Esto último favorece la invasión del tracto respiratorio por muchos microorganismos, como son: bacterias, micoplasmas y virus, considerados patógenos potenciales que juegan un importante papel etiológico en las enfermedades respiratorias del cerdo. Una característica común es que las enfermedades respiratorias del cerdo dan como resultado una deficiente conversión alimenticia. (15, 27, 72)

Las micoplasmosis de los cerdos son enfermedades crónicas que adquieren mayor relevancia al erradicarse problemas más agudos (como por ejemplo pleuropneumonia infecciosa porcina) y al concentrarse a los animales. Esto permite la diseminación de los micoplasmas, que en general es por contacto directo. (57)

Los micoplasmas considerados parásitos y patógenos para los animales están en las familias *Mycoplasmataceae* y *Acholeplasmataceae*. (12)

De las diferentes especies de micoplasmas que se han aislado en los cerdos sólo tres han sido asociadas muchas veces con síndromes clínicos a nivel de campo: *Mycoplasma hyopneumoniae* (*suipneumoniae*), *Mycoplasma hyorhinis* y *Mycoplasma hyosynoviae*. Considerando a *Mycoplasma flocculare* como un habitante no patógeno, común en los pulmones de los cerdos; la primera especie es de interés en el presente estudio. (35, 73, 81)

Aunque otros microorganismos pueden causar alteraciones patológicas parecidas, las pruebas actuales sugieren que *Mycoplasma hyopneumoniae* es el agente primario de la enfermedad, conocida como neumonía enzoótica de los cerdos, caracterizada clínicamente por ser crónica no productiva, retardo en el crecimiento, deficiente conversión alimenticia y baja mortalidad. (8, 73)

Mycoplasma hyopneumoniae, es seguramente el principal factor de inmunosupresión para el tracto respiratorio en cerdos y se encuentra prácticamente en todas las granjas del país; como responsable de la enfermedad, que si bien no provoca muertes, sí retrasa el crecimiento de los cerdos, hasta en 37.5 g diarios por cada 10% de pulmón afectado. Reduce en 10 a 20% la conversión alimenticia e incrementa de 10 a 25 los días al mercado. Además se menciona que arriba del 80% de los pulmones pueden mostrar las lesiones de neumonía enzoótica. (23, 24, 43)

Se menciona que la mejor forma de prevenir la enfermedad es aplicando la vacuna contra *Mycoplasma hyopneumoniae*, tanto a cerdas como a los lechones y mejorando las condiciones de manejo. (14, 24)

Otras vías para prevenir la neumonía enzoótica además de la vacunación, incluyen el sistema "todo dentro-todo fuera", el programa primario libre de patógenos específicos (SPF), el destete temprano medicado, destete precoz medicado modificado, destete precoz segregado, producción en múltiples sitios, todas estas vías son efectivas, pero requieren considerables cambios en manejo y alojamiento. (14, 24)

Un estudio menciona que el sistema "todo dentro-todo fuera" es una medida de manejo que da excelentes resultados en la prevención de neumonías; ya que puede reducir la prevalencia y severidad de la enfermedad. Incrementándose también la ganancia de peso en cerdos llevados de piaras afectadas por neumonía enzoótica. (14, 43)

La forma más comúnmente empleada para controlar y prevenir los problemas respiratorios, es a través de la medicación, tanto en el alimento como en el agua de bebida, además de tratamientos parenterales. Los resultados son aceptables, pero el costo es alto, hay desarrollo de resistencia bacteriana y necesidad de rotar o cambiar antibióticos; aún así quedan casos crónicos y presencia constante del problema que se exagera ante los agentes inmunosupresores. (23)

En la mayoría de las situaciones, el control práctico se basa en reducir el número de microorganismos más que en la erradicación total. Se requiere un acercamiento multifactorial para controlar al *Mycoplasma hyopneumoniae* debido a la presencia de otros microorganismos, a la dinámica de la enfermedad en la pira y al potencial de interferencia de la vacunación con los anticuerpos calostrales. (75)

La vacunación y la medicación estratégica de las hembras puede intentarse para reducir la transmisión hembra-lechón. Los beneficios de la medicación estratégica se han reportado en varios estudios. En la mayoría de las granjas, se recomienda que se vacunen a las hembras cuando ingresan al pie de cría sin importar si fueron o no vacunadas previamente. Se recomienda evitar la vacunación antes del parto pues existe el potencial de interferencia de los anticuerpos pasivos con la vacunación de los lechones. (75)

En un estudio de campo realizado para evaluar dos vacunas comerciales en lechones aplicando 2 ml vía intramuscular, la primera dosis a 1-2 semana de edad, y la segunda 2-3 semanas después, se encontró que la vacunación contra *Mycoplasma hyopneumoniae*, puede disminuir de manera significativa lesiones pulmonares y la prevalencia de la bronconeumonía a la inspección al rastro, siendo las lesiones en la mayoría de los cerdos, relativamente limitadas, y probablemente no influyeron en la condición general y apetito. (40)

No hay tratamiento eficaz que elimine la infección por *Mycoplasma hyopneumoniae*; los antibióticos y las vacunaciones utilizadas para el tratamiento y control de esta enfermedad han sido ineficaces, aunque puede disminuirse con medios terapéuticos la gravedad de las manifestaciones clínicas. (8, 23,73)

Los antibióticos de amplio espectro, lincomicina, tilmicosina, tilosina, tiamulina, espectinomina, espiramicina, quinolonas y generalmente las tetraciclinas, son los medicamentos que más se usan, pero la respuesta sólo es moderadamente buena. No obstante en los pasados años un antibiótico quinolona y dos vacunas han demostrado reducir la prevalencia y el tamaño de las lesiones pulmonares. (8, 14, 23,73)

En una evaluación in vitro de varias quinolonas contra micoplasmas y bacterias patógenas respiratorias en cerdos, así como estudios de sensibilidad de diferentes micoplasmas bovinos y porcinos a agentes antibacterianos en medio líquido de prueba comparado a disco, encontraron que las quinolonas mostraron una actividad marcadamente superior a la tilosina y a la tiamulina contra las bacterias respiratorias y son generalmente más activas que la gentamicina y la oxitetraciclina. Ciprofloxacina en particular fue extremadamente activa contra *Pasteurella multocida* y tiene una excelente actividad micoplasmicida contra *Mycoplasma hyopneumoniae*, en otra información se reporta también haber obtenido buenos resultados con el uso de la danofloxacina. Se administra una vez al día durante tres días. Brinda una respuesta más rápida y efectiva que la oxitetraciclina o la tilosina ; por lo que se puede determinar que las nuevas fluoroquinolonas tienen una distinta ventaja in vitro sobre los antibióticos existentes comúnmente utilizados para tratar las infecciones respiratorias en cerdos y tienen un gran potencial en el tratamiento de esas infecciones. (14, 15, 26, 31)

Lo anterior nos indica que, es más conveniente desde muchos puntos de vista, enfrentar el problema en forma integral, desarrollando un adecuado control de los factores predisponentes, mediante programas de manejo, inmunidad y medicación y no solamente atacando al microorganismo identificado al final de un proceso. (23)

V GENERALIDADES

5.1 APARATO RESPIRATORIO DEL CERDO

El aparato respiratorio del cerdo está constituido por los pulmones y los pasajes aéreos asociados, donde se incluyen: ollares, cavidad nasal, faringe, laringe, tráquea, bronquios, bronquiolos, alvéolos pulmonares y pleura. (65)

Los pulmones son los órganos donde se lleva a cabo el intercambio gaseoso entre el organismo y el medio ambiente, participan activamente en defensa de las agresiones del medio, además son el asiento de reacciones inmunes locales o sistémicas. (53)

La supervivencia del animal requiere por fuerza la eliminación total de los microorganismos invasores. El aparato respiratorio de los animales representa uno de los sistemas de defensa mejor integrados; al estar continuamente expuesto a las partículas y los microorganismos presentes en el aire inhalado, requiere por consiguiente un mecanismo eficiente para disponer de esos agresores, por lo que posee una variedad de mecanismos de defensa para protegerlo contra las sustancias potencialmente lesivas. (49, 54, 57, 77)

5.1.1 MECANISMOS DE DEFENSA

Los mecanismos de defensa respiratorios que pueden proveer de una protección adecuada al animal en su ambiente natural, con frecuencia son sobrepasados por el estrés o la intensificación; Por lo que el animal es más susceptible a las enfermedades respiratorias. (53)

Los mecanismos de defensa con que cuenta el aparato respiratorio pueden dividirse en inespecíficos (innatos) y específicos (inducibles). Ambos trabajando en conjunto, permiten que el aparato respiratorio posterior se mantenga virtualmente estéril. En la actualidad se reconoce que ambos sistemas actúan concertadamente y dicha acción tiene propiedades sinérgicas. (80)

5.1.1.1 MECANISMOS DE DEFENSA INESPECIFICOS

A su vez, estos mecanismos, pueden agruparse en tres categorías: anatomofisiológicos, bioquímicos, y celulares. (47)

1-Anatomofisiológicos.

Estos constituyen la primer barrera de defensa y en el tracto respiratorio están representados por el aparato mucocilar en tráquea y bronquios, los cometes nasales, la mucosa nasal, y los reflejos del estornudo y los tusígenos. (47)

Los cornetes nasales con forma en espiral dividen la cavidad nasal en canales de conducción que crean turbulencias del aire inspirado, dando lugar al impacto de las partículas mayores de 10μ . Las partículas depositadas son eliminadas del aparato respiratorio mediante la membrana mucosa ciliar. A nivel bronquial otras turbulencias filtran las partículas de 3 a 10μ , mientras que aquellas partículas con diámetro menor a 2μ (la mayor parte de bacterias y micoplasmas están comprendidas entre las $0.5-2\mu$), pueden llegar al espacio alveolar donde deben ser removidas por células fagocíticas especializadas (pneumocito II o macrófago alveolar). (30, 80)

El aparato mucociliar se extiende desde las fosas nasales hasta los bronquiolos terminales, y está constituido por el epitelio ciliado de la mucosa traqueal y bronquial; se encuentra cubierto por una capa de moco que es secretada por células caliciformes, células serosas y glándulas mucosas. El moco producido tiene características particulares que dependen de la edad y de la condición orgánica del individuo. La profundidad de la capa de moco normalmente es de 5 micras y si este grosor se ve aumentado, como sucede bajo algunas condiciones patológicas hasta en 5 veces la longitud de los cilios, estos no son capaces de movilizarlo. (30, 54, 80)

Una vez que las partículas han quedado adheridas a la mucosa son eliminadas por medio del aparato mucociliar. El aparato mucociliar irá empujando este moco hasta ser deglutido y procesado por el sistema digestivo. Esta limpieza puede ser incrementada por el reflejo tusígeno. (30, 80)

2-Bioquímicos

Aquí se consideran sustancias o enzimas con actividad antimicrobiana o antiviral. Los exponentes más importantes de este grupo son: lisozima, complemento, e interferón. El moco tiene un alto contenido de lisozima. El moco debe retener y neutralizar las partículas adheridas, funcionando como una barrera química o enzimática. Los carbohidratos presentes en el moco, que además de darle cierta carga eléctrica, son capaces de bloquear muchos de los receptores bacterianos tipo lectinas. El complemento es un conjunto de proteínas séricas que a consecuencia de procesos inflamatorios puede encontrarse en el tracto respiratorio. El interferón es un conjunto de proteínas que liberan ciertas células (por ejemplo leucocitos) cuando son infectados por un virus. (47, 80)

3-Celulares

Aquí se incluye a la respuesta inflamatoria y a la fagocitosis. La inflamación representa un importante mecanismo de defensa, ya que previene la diseminación de la bacteria y facilita su fagocitosis. La inflamación es un proceso vascular caracterizado por la liberación de aminas vasoactivas (histamina) que provoca una vasodilatación con la consiguiente disminución del flujo sanguíneo, seguida de extravasación de líquido y células fagocitarias, al principio polimorfonucleares, después macrófagos y proteínas séricas

(inmunoglobulinas, complemento) importantes en la defensa del tracto respiratorio. (47, 49)

El contacto permanente del pulmón con una gran cantidad de antígenos hace suponer que los mecanismos de protección previenen el desarrollo de reacciones inmunes sutiles. La capacidad que tienen los macrófagos para fagocitar las partículas exógenas le permite jugar un papel importante en la homeostasis pulmonar. Por el contrario, bajo ciertas circunstancias, el pulmón puede ser rápidamente el asiento de reacciones inflamatorias e inmunes intensas. El reclutamiento de los polimorfonucleares neutrófilos y eosinófilos, de linfocitos y de mastocitos liberan grandes cantidades de mediadores, pueden terminar en fenómenos lesivos que impiden su función de filtro por los intercambios gaseosos. (53)

5.1.1.2 MECANISMOS DE DEFENSA ESPECIFICOS

Comprenden la respuesta inmune, la cual tiene dos manifestaciones: inmunidad humoral e inmunidad celular. (48)

1-Inmunidad humoral (figura 1). Esta consiste en la síntesis de inmunoglobulinas (Ig) o anticuerpos específicos. El aparato mucociliar, además de proveer un vehículo para movilizar fuera del pulmón a las partículas y los microorganismos que se han inhalado, mediante el flujo constante de mucus hacia fuera de los alveolos, bronquiolos, bronquios y tráquea, es de importancia por su habilidad para vehicular inmunoglobulinas dentro del tracto respiratorio. Las vías respiratorias tienen una cantidad considerable de tejido linfóide que forma nódulos en las paredes de los bronquios y está revestido por linfocitos que se distribuyen de manera difusa en el pulmón y en las paredes de las vías aéreas. Dichos tejidos sintetizan principalmente IgA secretoria, en especial en las vías respiratorias superiores (fosas nasales), producida en su mayoría localmente. Se piensa que la función principal de esta inmunoglobulina es la de impedir que microorganismos establezcan contacto y colonicen la mucosa. Las inmunoglobulinas predominantes en el mucus bronquial son IgA, IgG e IgM. La relación de IgA:IgG varía, siendo la IgA predominante en las secreciones nasales y la IgG en las secreciones broncoalveolares. Como en otras superficies corporales, se cree que la IgA de las vías respiratorias ejerce su acción protectora al evitar la adherencia de las partículas antigénicas, y entre ellas de los microorganismos, mientras que IgG sólo parece tener una gran importancia cuando se produce una inflamación aguda y la correspondiente trasudación de proteínas séricas. La IgG no sólo activa al complemento (a través de la llamada vía clásica) sino que participa en el fenómeno denominado opsonización, o sea, el recubrimiento de microorganismos por anticuerpos específicos los cuales favorecen la fagocitosis de los gérmenes ya que los macrófagos y neutrófilos poseen receptores específicos para este tipo de inmunoglobulina. En los tejidos linfoides de las vías respiratorias superiores también se sintetiza una cantidad importante de IgE; usualmente no se asocia con mecanismos protectores. Este anticuerpo se encuentra normalmente adherido a la superficie de células cebadas y se piensa que puede constituir una segunda barrera contra aquellos microorganismos al evadir a la IgA y

penetrar la mucosa. En este caso la reacción de IgE con un microorganismo producirá la liberación de aminas vasoactivas contenidas en el interior de las células cebadas. Actuando éstas como mecanismo amplificador de la respuesta inflamatoria facilitando la llegada de anticuerpos séricos y células sanguíneas como linfocitos, neutrófilos y monocitos. (48,77)

Sin embargo, el contenido de inmunoglobulinas de las secreciones del tracto respiratorio no depende sólo de su producción en las células plasmáticas mucosas, los lechones que ingirerán calostro, presentan inmunoglobulinas en las secreciones nasales desde el momento de ingerir el primer alimento. (52)

En el calostro de la cerda se encuentra el inhibidor de la tripsina, que inhibe totalmente la actividad trípica en la luz intestinal de los lechones recién nacidos por aproximadamente 3 días, permitiendo que ocurra la absorción intestinal de la IgG en forma intacta; los lechones que han ingerido calostro, tienen mejores respuestas de anticuerpos a los diferentes antígenos que los que no fueron calostrados y la actividad de lisosima y bactericida del suero está aumentada. Tras la ingestión de calostro la inmunoglobulina predominante en las secreciones nasales es IgA. (52)

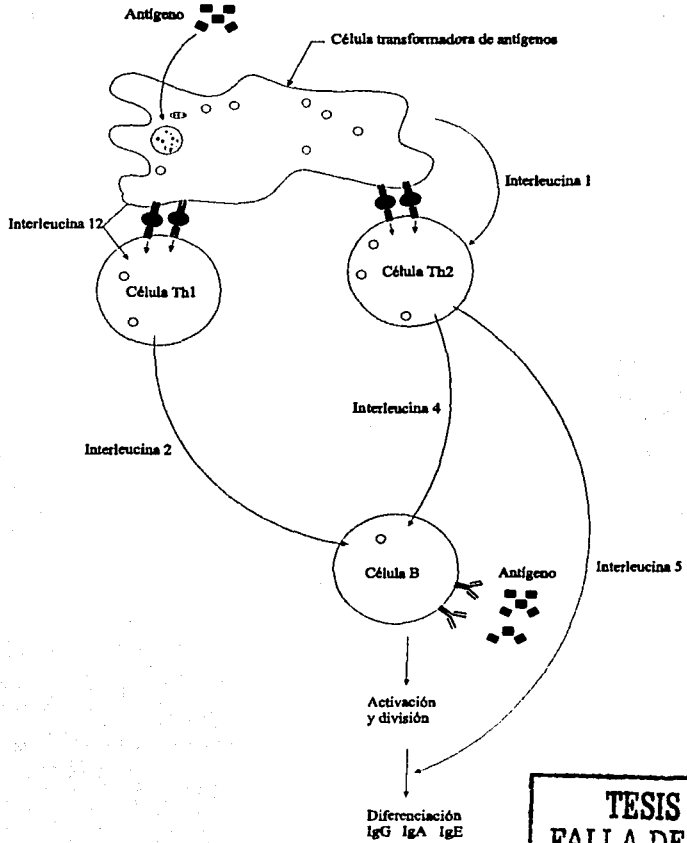
Además de la inmunidad específica que proporciona el calostro y la leche a los lechones, existe una transferencia de factores inespecíficos de resistencia. Entre estos se encuentra principalmente la lactoferrina que es una proteína con propiedades bacteriostáticas; otras sustancias son el sistema lactoperoxidasa-tiocianato-peróxido de hidrógeno. Una de las sustancias más importantes en el calostro y la leche es la lisosima como bacteriostático y bacteriolítico. Otra sustancia es la properidina. Además hay proteínas básicas como la betalisisina y ubiquitina, y la xantina oxidasa. También existen proteínas que unen a la vitamina B12 y el folato. (52)

2- Inmunidad celular (figura 2). La inmunidad mediada por células está involucrada en control de virus, bacterias, parásitos intracelulares y células tumorales. Está regulada por los linfocitos T, y hay básicamente dos tipos de células implicadas en esta protección: las células T cooperadoras (CD4+) y las T asesinas (células T citotóxicas, CD8+). Las CD8+ son células especializadas en la destrucción de células que han sido infectadas por un virus. Estos linfocitos reconocen antígenos virales en la membrana de la célula "blanco" y la destruyen a través de la liberación de factores citolíticos. Las CD4+ actúan como mediadores reguladores de todo el sistema inmune, incluyendo la producción de anticuerpos; son aquellas que al contacto con el microorganismo o antígeno microbiano liberan factores solubles (denominados citocinas) que pueden tener funciones diversas. Destacando aquellas que ejercen un efecto quimiotáctico y de activación sobre macrófagos. Como ejemplo se tienen al factor inhibidor de la migración. La primera función mediada por linfocinas que se descubrió es la migración de macrófagos fuera del tubo capilar *in vitro*. El gamma interferón es la única de varias proteínas que inhibe la migración de macrófagos. Esta actividad MIF está mediada por IL-4. El factor estimulador de colonias de macrófagos, estas glucoproteínas relacionadas derivan de fibroblastos y macrófagos; su producción es estimulada por la IL-1 y TNF-alfa, este factor induce la proliferación y diferenciación de monocitos y macrófagos, y promueven la citotoxicidad de los macrófagos. El factor estimulador de colonias de granulocitos-

macrófagos, es una glucoprotéina que se deriva de los macrófagos, actúa como factor de crecimiento para las células progenitoras mieloides; activa a los macrófagos e intensifica su producción de superóxido, fagocitosis, actividad tumoricida y expresión de antígenos clase II del CMH; proporciona una señal a los macrófagos, la cual causa que se vuelvan "macrófagos supresores". (47, 7)

Figura 1

INMUNIDAD HUMORAL

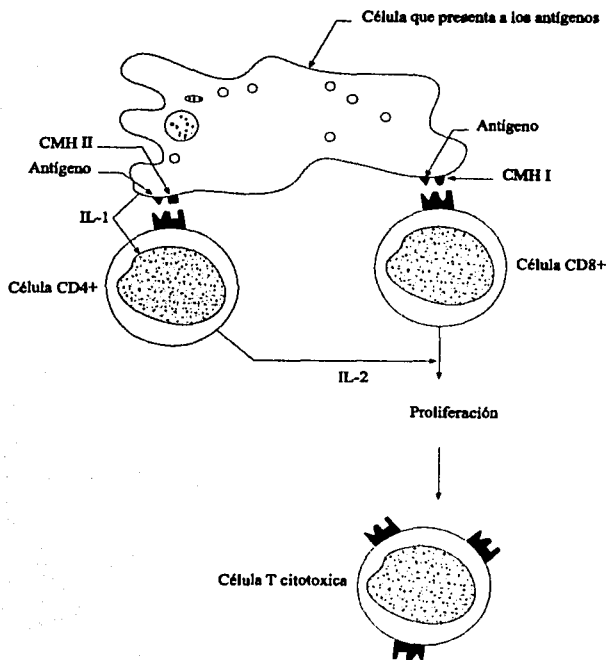


Participación de las citocinas en el “disparo” de la respuesta de la célula B.

Adaptado de Tizard 5a. Ed. 1998.

Figura 2

INMUNIDAD CELULAR



Interacciones celulares entre una célula de las que presentan a los antígenos, una célula citotóxica CD8+ y una célula colaboradora CD4+.

Adaptado de Tizard 3a. Ed. 1987.

5.2 CONSIDERACIONES GENERALES DE LOS MICOPLASMAS.

Es a partir de la producción de formas filamentosas tipo hongos de la que se deriva el nombre micoplasma (*myco* = "hongos"). (9)

Los microorganismos de este grupo pertenecen a la clase *Mollicutes* (mollis=blanda; cutis=piel), esta clase es la única en la división tenericutes, una de las cuatro divisiones del reino procariota. Comprenden actualmente un solo orden: *Mycoplasmatales* y tres familias: *Mycoplasmataceae*, *Acholeplasmataceae* y *Spiroplasmataceae*. Los cuatro géneros de los mollicutes están ampliamente distribuidos en la naturaleza, encontrándose en los animales (*Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*) así como en las plantas y los insectos (*Spiroplasma*, *Acholeplasma*, *Mycoplasma*). No obstante sólo dos géneros de la primer familia contienen patógenos o saprófitos en animales *Mycoplasma* y *Ureaplasma*. (5, 6, 35, 51, 57)

La subdivisión en familias está basada en su habitat, requerimientos de esterol para su crecimiento, tamaño de su genoma, y su tolerancia al oxígeno. Otra diferenciación en género toma en cuenta el mecanismo usado por el microorganismo para obtener su energía (fermentación de glucosa, arginina, o urea) Las especies se clasifican por sus aspectos bioquímicos y serológicos. (5, 6, 33, 81)

Los mollicutes (micoplasmas) son las bacterias de vida libre de menor tamaño, son considerados parásitos extracelulares dependientes del hospedero. (5, 11, 33, 51, 56)

El término micoplasma se usa para agrupar organismos procariotes que se distinguen fenotípicamente de otras bacterias por presentar dimensiones mínimas próximos al límite de resolución del microscopio óptico que han perdido su habilidad para sintetizar una pared celular. (5, 28, 33, 70, 81)

La falta de pared celular en los micoplasmas ha sido demostrada por microscopía electrónica y por análisis químico; éste último confirmó los componentes claves de la pared. (9, 11)

Así mismo, el carecer de un mecanismo genético para formar la pared celular explica sus propiedades morfológicas y su marcado pleomorfismo (11, 33, 56)

Aún cuando los micoplasmas asemejan protoplastos en la carencia de pared celular, son más resistentes a la lisis osmótica, esta habilidad, se debe en parte a la naturaleza de la membrana celular del micoplasma, que es más estable que la de otros procariontes. En un grupo de micoplasmas, la membrana contiene esteroides, que parecen ser responsables de la estabilidad. (9)

Los micoplasmas que poseen esteroides en su membrana no los sintetizan, pero los requieren preformados en el medio de cultivo. (9)

La ausencia de pared celular, por consecuencia su incapacidad de sintetizar peptidoglicano y sus precursores, explica principalmente la susceptibilidad de los micoplasmas al choque

osmótico, a la actividad de detergentes, alcoholes, anticuerpos específicos, a las sustancias que disminuyen la tensión superficial (jabones, amonio cuaternario y tween), la resistencia a los antibióticos del grupo de las penicilinas y sus análogos que impiden la síntesis de la pared celular. (5, 6, 33, 57, 59, 70, 81)

Por lo general son resistentes al acetato de talio, pero son sensibles a los antibióticos que obstaculizan el metabolismo de los aminoácidos, del ácido nucleico (transcripción y traducción de la enzima DNA girasa), de los esteroides. El yodo y los compuestos fenólicos los destruyen con facilidad. (5, 6, 28, 59, 81)

Esta ausencia de pared celular es el origen de algunas características más propias de virus que de bacterias. Tal como la neutralización por antisueros. Por lo cual durante mucho tiempo, los micoplasmas se consideraron virus. (5, 11, 32, 57, 59, 81)

Al no tener las estructuras de la membrana interna ni pared celular externa en la membrana plasmática, muchas cepas poseen estructuras superficiales equivalentes a la cápsula; están rodeados por una membrana plasmática formada por proteínas, glucoproteínas, glucolípidos y fosfolípidos. (6, 32, 56)

La morfología es variable, depende del método de examen, (por ejemplo: campo oscuro, inmunofluorescencia, frotis teñidos por el método Giemsa y medios sólidos o líquidos, fijación en agar). (11, 33)

Morfológicamente, los micoplasmas presentan apariencia esférica o piriforme (con un diámetro de 0.3-0.8 μm) hasta fusiforme o filamentos helicoidales. Durante la replicación del genoma y división celular se puede apreciar formas de dona, filamentos y cadenas de cocos. (5, 12, 70)

El crecimiento en medio líquido origina muchas formas diferentes desde cocoides a formas pleomórficas y filamentosas. El crecimiento en medios sólidos consiste principalmente en masas protoplásmicas plásticas de forma indefinida que se deforman con facilidad. (6, 33)

En frotis teñidos se observan como formas circulares, pequeños cocobacilos, filamentos. Las células pueden ser cocoides o piriformes, a veces con extensiones filamentosas, o bien crecen como finos filamentos ramificados o sin ramificar. (11, 12, 33, 73, 81)

Su naturaleza flexible y su pequeño tamaño le permiten atravesar filtros de membrana con un poro de 220 a 450 nm. Las colonias de los micoplasmas tienen un diámetro que puede oscilar de 0.01 a 1.0 mm, y aparecen con la forma típica de huevo frito. (6, 12, 51, 56)

Los micoplasmas presentan tres organelos celulares esenciales: membrana celular, ribosomas y el genoma característico de las células procariotas (DNA de doble hebra), su genoma mide: 4.5×10^8 daltons, están catalogados como microorganismos con capacidad de autoreplicación. (5, 6, 12, 51, 56)

Debido a la ausencia de pared celular los mollicutes son gramnegativos, se tiñen escasamente con la tinción de Gram. El método de elección para teñirlos es el método de

Giemsá o bien otros métodos de tinción de tipo Romanowsky. (6, 12, 51, 56)

Son sensibles a la digitonina, anaerobios facultativos, catalasa negativos. (11, 12, 56)

La mayoría de los micoplasmas no tienen movimiento y no tienen flagelos; sin embargo, algunas especies patógenas de micoplasmas incluyendo de humanos y de animales. *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *M. gallisepticum* y *M. pulmonis*, presentan gran motilidad en superficies húmedas. (5)

Las especies lisas de micoplasmas regularmente presentan una estructura tipo la cual juega un papel importante en la adhesión a las células del hospedador. (5)

La división puede hacerse por medio de gemación, fragmentación o fisión binaria, de manera simple o en combinación. (6, 12, 33, 70)

La mayoría de los mollicutes son microorganismos exigentes que, para crecer, necesitan un medio base complejo suplementado con suero y con extracto de levadura. Los ácidos grasos no saturados y los precursores de estos ácidos son factores de crecimiento esenciales. Todos los mollicutes, excepto las especies del género *Acholeplasma* y algunas del género *Anaeroplasmá*, necesitan colesterol, el cual es aportado por el suero. Los micoplasmas requieren también ácidos grasos y proteínas, los cuales pueden suplirse con suero y, por ello los medios para el cultivo de estos microorganismos se suplementan comúnmente con un 20 % de suero de caballo. (11, 12, 51, 56, 57, 70)

El pH óptimo de los medios en los cuales crecen las especies del género *Ureaplasma* es de 6.0; para los demás mollicutes es de 7.5; la temperatura óptima de crecimiento es de 37-39 °C. Los mollicutes son aerobios facultativos o microaerófilicos, excepto el género *Anaeroplasmá* que es anaerobio estricto. (12)

La mayoría de los mollicutes utilizan la glucosa o la arginina, mientras que algunos utilizan ambas como fuente de energía. (12)

Algunas especies patógenas y no patógenas se establecen como comensales en las membranas mucosas del tracto respiratorio superior y tracto digestivo, tracto genital y la ubre bovina (12, 28, 33, 56)

Con algunas excepciones, los micoplasmas al igual que los virus, son microorganismos que demuestran una gran especificidad para cada especie animal y son raros los que afectan a varias especies animales. Esta adaptación puede estar basada en factores específicos de colonización, (mediante los cuales) el hospedero tiene los receptores, o esto puede estar basado en la incapacidad del hospedero para reconocer y responder al microorganismo. (12, 28, 33, 56, 81)

Cuadro I

TAXONOMIA Y PROPIEDADES DE LOS MICOPLASMAS

Clasificación	Número actual de especies reconocidas	Tamaño del genoma (MDa)	Contenido de GC (mol%)	Requerimientos de colesterol	Propiedades distintivas	Habitat
Orden I: Mycoplasmatales Familia I: Mycoplasmataceae Género I: <i>Mycoplasma</i>	87	400-800	23	+	-	Humanos, animales, plantas, insectos.
Género II: <i>Ureaplasma</i>	5	500-700	27-30	+	Ureasa positiva	Humanos, animales.
Familia II: Spiroplasmataceae Género I: <i>Spiroplasma</i>	11	1000	25-31	+	Filamentos helicoidales	Artrópodos (incluyendo insectos) y plantas.
Orden II: Acholeplasmatales Familia: Acholeplasmataceae Género I: <i>Acholeplasma</i>	11	1000	27-36	-	-	Animales, plantas, insectos.
Orden III: Anaeroplasmatales Familia: Anaeroplasmataceae Género I: <i>Anaeroplasma</i>	4	1000	29-33	+	Anaerobios Obligados	Rumen de bovinos-ovinos.
Género II: <i>Asteroleplasma</i>	1	1000	40	-	(sensibles al Oxígeno)	Rumen de bovinos-ovinos.

Cuadro 2

PROPIEDADES MOLECULARES QUE DISTINGUEN A LOS MOLLICUTES DE OTRAS EUBACTERIAS.

Propiedad	Mollicutes	Otras eubacterias
Pared celular	Ausente	Presente
Peptidoglican	Ausente	Presente
Tamaño del genoma	500-1000 MDa	>1000 Mda
Contenido de GC en su genoma	23-41 mol%	25-75 mol%
Número de proteínas celulares detectables	<400	>1000
Número de operón RNAr detectable	1-2	1-10
Longitud RNAr 5S	104-113 nucleótidos	>114 nucleótidos
Número de genes de factores elongación Tu (<i>tuf</i>)	1	1 o 2
RNA polimerasa	Resistente a rifampicina	Sensible a rifampicina
Codón empleado UGA	Codón triptófano en <i>Mycoplasma</i> y <i>Spiroplasma</i> (no en <i>A. laidawii</i>). Una enzima en <i>Mycoplasma</i> y <i>Ureaplasma</i> , tres en <i>Acholeplasma</i> y <i>Spiroplasma</i> .	Codón de terminación
Complejo DNA polimerasa		Tres enzimas.

Razin 1989.

Cuadro 3

ESPECIES DE *MICOPLASMA* PATÓGENOS

Especies	Hospedadores	Enfermedades específicas	Enfermedades inespecíficas
<i>M. agalactiae</i>	Ovinos	Agalaxia contagiosa	artritis, vulvovaginitis
<i>M. bovigenitalium</i>	Bovinos	Mastitis	
<i>M. bovis</i>	Bovinos	Mastitis	
<i>M. bovoculi</i>	Bovinos		queratoconjuntivitis
<i>M. californicum</i>	Bovinos	Mastitis	
<i>M. capricolum</i>	Ovinos	Agalaxia contagiosa	
<i>M. conjunctivae</i>	Ovinos	Queratoconjuntivitis	
<i>M. dispar</i>	Bovinos	Mastitis	neumonía
<i>M. felis</i>	Felinos	Conjuntivitis	
<i>M. hyopneumoniae</i>	Porcinos	NEUMONÍA ENZOOTICA	
<i>M. hyorhinis</i>	Porcinos	Poliserositis-poliartritis	
<i>M. hyosinoviae</i>	Porcinos	Artritis	
<i>M. mycoides ss capri</i>	Ovinos	Pleuroneumonía contagiosa	
<i>M. ovipneumoniae</i>	Ovinos	Neumonía atípica	
<i>M. pneumoniae</i>	Hombre	Neumonía atípica.	

Lista parcial de especies de *Mycoplasma* agentes etiológicos primarios de enfermedades específicas y/o se han asociado con varias enfermedades de los animales domésticos.

Scanlan 1991.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.3 *Mycoplasma hyopneumoniae*

5.3.1 Características generales

Taxonomía de este micoplasma es la siguiente: División tenericutes, miembros de la clase Mollicutes, orden I: Mycoplasmatales, familia I: Mycoplasmataceae, género I: Mycoplasma, especie *Mycoplasma hyopneumoniae*. (11, 42, 81)

Al microscopio electrónico, se observa que las células de *Mycoplasma hyopneumoniae* tienen una forma redondeada con un diámetro que varía entre 0.2 – 0.5µm, están limitados únicamente por una membrana plasmática, contienen ribosomas dentro del citoplasma y fibras de DNA. No contienen pared pero se observa una "cápsula" en la superficie externa de la membrana plasmática con la coloración rojo de ruthénium según Tajima y Yagihashi, estos mismos autores describen también la existencia de fibrillas radiales aparentemente de material capsular. (35)

Su identificación se efectúa generalmente mediante una prueba serológica. La prueba consiste en la inhibición del crecimiento (o el metabolismo) del micoplasma. Las colonias pueden ser igualmente identificadas por inmunofluorescencia. (35, 81)

Las colonias pueden ser observadas fácilmente con la ayuda de un microscopio invertido equipado con un objetivo de 10 X. (6)

5.3.2 Cultivo y aislamiento

Mycoplasma hyopneumoniae es uno de los micoplasmas más difíciles de cultivar, por lo que su aislamiento es complicado por que los requerimientos para su crecimiento son extremadamente exigentes, requiere un medio basal complejo, es cultivado en medios altamente enriquecidos, provistos de carbohidratos y aminoácidos para su energía metabólica y síntesis protéica, y lípidos para la síntesis de membrana. (11, 12, 33, 38)

Son esenciales como factores de crecimiento precursores de ácidos grasos no saturados requiere colesterol o esteroides relacionados, el cual es suplementado por el suero y es incorporado dentro la membrana, produciendo suficiente estabilidad osmótica para sobrevivir bajo condiciones fisiológicas normales, es incapaz de sintetizar purinas y pirimidinas; por lo que se han desarrollado medios perfeccionados y técnicas selectivas para el aislamiento del agente. (11, 12, 28, 32, 33, 38)

Probablemente el medio más ampliamente usado es el descrito por Friis (12, 35, 38)

Crece generalmente en medios consistentes en infusión de corazón con caldo de peptona, NaCl, 20% suero de caballo y 10% extracto de levadura; se adiciona agar al medio sólido, 2% inhibidores de crecimiento bacteriano, que incluyen penicilina (Gram +) y acetato de talio (Gram -) (12)

El tiempo de incubación requerido es de 10-14 días para que sea observado el crecimiento; el crecimiento de *M. hyopneumoniae* es lento, particularmente durante el aislamiento primario, produciendo una leve turbidez y un cambio de color ácido después de 3-30 días de incubación. (35, 81)

El crecimiento de *M. hyopneumoniae* se efectúa en tres fases: una fase exponencial, una fase estacionaria y una fase de envejecimiento, lo que confirma que la división binaria es su forma de reproducción. (35)

M. hyopneumoniae fermenta la glucosa a 37° C produce una acidificación que da como resultado una disminución del pH del medio de cultivo. Esto se interpreta por una variación de color del indicador (variación de pH de 7.4 a 6.3), existe por lo tanto una relación entre el crecimiento del microorganismo y la variación del pH del medio de cultivo. (35)

El pH óptimo para su crecimiento es 7.5. La temperatura óptima 37°-39° C. Es aerobio facultativo o microaerofílico, requiere baja tensión de oxígeno y alta humedad para su crecimiento; utiliza glucosa como fuente de energía, no metaboliza la arginina ni la urea (35, 81)

Las colonias en medio sólido son pequeñas, convexas (0.5 -1 mm de diámetro), no presenta la protuberancia central de otras especies, su apariencia es de gotas de rocío. Hay una tendencia del microorganismo a penetrar y crecer dentro del medio. El tamaño es de 200-500 nm, y pueden ser observados en frotis teñidos con el método de Giemsa. (29, 33, 81)

5.4 NEUMONÍA ENZOÓTICA PORCINA

5.4.1 DEFINICIÓN

La neumonía enzoótica porcina, es una enfermedad pulmonar infectocontagiosa de los cerdos, provocada por una bacteria *Mycoplasma hyopneumoniae*. (8, 73)

5.4.2 ANTECEDENTES

En 1948, 1951 la caracterización definitiva de una neumonía crónica distinta de la influenza porcina, emergió con el trabajo de Pullar y Gulrajani-Beveridge, respectivamente. Por ser un agente filtrable se aplicó y usó extensamente el término de virus neumónico de los cerdos. (39)

En 1957 Wittlstone, sugirió que el agente causal de la enfermedad podría ser un micoplasma.

En 1965 los micoplasmas fueron aislados y se demostraron al reproducir la enfermedad virtual y simultáneamente en Estados Unidos (Maré y Switzer) y en Inglaterra (Goodwin et

al). Los aislamientos se nombraron *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Mycoplasma suis* respectivamente, dándole prioridad al nombre de *Mycoplasma hyopneumoniae*. (39, 57)

5.4.3 SINERGIA

La infección sola con *Mycoplasma hyopneumoniae* tiene muy poco impacto sobre la tasa de crecimiento y el estado sanitario del cerdo. Sin embargo se puede encontrar en asociación con *Pasteurella multocida* (Pm), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App), *Streptococcus suis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Haemophilus parasuis*, el virus de Pseudorabia (Prv) y el virus PRRS. Experimentalmente se ha demostrado que *M. Hyopneumoniae* incrementa la severidad de la neumonía causada por Pm, App, Prv, y PRRS. (17, 71)

5.4.4 EPIZOOTIOLOGÍA

Se considera que la neumonía enzoótica está ampliamente diseminada en el mundo. El microorganismo habita en las vías respiratorias de los cerdos y parece tener especificidad de huésped. (8)

En México, los trabajos con pulmones colectados en rastro realizados por Pijoan, Ochoa y Trigo (1976), demostraron una incidencia de esta bacteria superior al 25%. (57)

Maqueda, citado por Cruz et al., habla de una incidencia de la enfermedad, determinada por lesiones neumónicas, de 20 a 25%. (18)

En Estados Unidos, los resultados de un estudio conducido por el Sistema Nacional de Monitoreo en Salud Animal (NAHMS), demostro que las enfermedades porcinas están ampliamente diseminadas en la industria porcina, encontrando que de 396 a 428 piaras inspeccionadas voluntariamente, el 98% estaban afectadas por neumonía enzoótica. La prevalencia de lesiones en un muestreo aleatorio en aproximadamente 6000 cerdos sacrificados entre 1990-91 se observó que el 71% de los animales inspeccionados estaba afectado por neumonía enzoótica. (24)

La transmisión del agente es a través de aerosoles o por contacto directo con secreciones de animales infectados con animales sanos. Se sabe que el hato reproductor es el principal reservorio de *Mycoplasma hyopneumoniae* en una granja. En la mayoría de los casos la fuente de contaminación es la cerda joven la cual tiene un bajo nivel de inmunidad y por lo general se encuentra infectada con *M. hyopneumoniae*. Las cerdas adultas tienden a ser inmunes (ya que con el tiempo se vuelven más resistentes, hay un aumento en sus niveles de inmunoglobulinas y de la inmunidad), y protegen a sus camadas por un periodo de cuatro a seis semanas de edad, pero los lechones llegan susceptibles a la crianza debido a la disminución de la inmunidad pasiva. Lo anterior indica que a pesar de que las infecciones con *Mycoplasma hyopneumoniae* tienden a iniciarse en la maternidad (transmisión vertical), una vez establecida la infección en los cerdos, sucede la transmisión en los corrales, especialmente después de que los animales se juntan al momento del destete. (8,

23, 50)

La enfermedad es muy contagiosa, puede presentarse en cualquier época del año; en granjas contaminadas ocurre año con año, observándose variaciones substanciales en severidad con el nivel de manejo, la estación del año, ventilación, concentración de cerdos, y otros factores del medio ambiente. (8, 38)

Aún cuando la mortalidad puede ser leve y los signos difíciles de detectar, los hatos en donde la enfermedad es enzoótica se ven constantemente amenazados por un brote si se presenta algún factor de estrés. (14)

La tasa de morbilidad es alta (30-80%), pero la mortalidad es generalmente de cero; el período de incubación puede variar entre 7-21 días e incluso en muchos casos puede ser superior a los 3 meses. (38, 42, 67)

En virtud del largo período de incubación, la lenta diseminación del microorganismo en las camadas, el incremento en la densidad de población, la diseminación de otros agentes y factores del medio ambiente que se desarrollan después del destete, la prevalencia mayor de la enfermedad ocurre en los cerdos en crecimiento y finalización. En este sentido se considera que la mayor influencia de la neumonía por *Mycoplasma hyopneumoniae* sobre la tasa de crecimiento ocurre entre 30 y 90 días después de la exposición. (23)

5.4.5. PATOGÉNESIS

Está bien establecido que la virulencia varía dentro de las mismas especies de micoplasmas. Las infecciones que originan, necesitan la presencia de ciertos factores predisponentes, ya mencionados. Estos microorganismos provocan en general reacciones inflamatorias crónicas, como consecuencia de su acción directa sobre el huésped y de la respuesta inmunológica de éste. (29, 51, 72)

Los buenos resultados obtenidos en el uso de vacunas a nivel de campo y experimental para el control de *Mycoplasma hyopneumoniae* pueden ser citadas como evidencia de que el microorganismo tiene el potencial de ser un buen inmunógeno. (60)

El *Mycoplasma hyopneumoniae* penetra con el aire inspirado, se adhiere al epitelio ciliado mediante una capa superficial aniónica que contribuye a la adhesión. La íntima asociación entre el micoplasma y los cilios puede ser un factor importante en la patogénesis de la enfermedad. (7)

Esta adherencia a las células del epitelio ciliado de la tráquea, bronquios y bronquiolos es un requisito para la colonización e infección; en donde puede permanecer por largos períodos, semanas a meses; se multiplica gradualmente en estos sitios, destruye los cilios, seguido de un efecto citopático y una exfoliación de las células epiteliales, por lo que hay interferencia con la remoción bacteriana e induce la exacerbación de las infecciones por *Pasteurella multocida* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*. El principio de la ciliostasis puede ser micoplasma inducido. (7, 12, 28, 29, 50, 67)

Simultáneamente puede ocurrir una reacción celular (consistiendo principalmente en un incremento en la acumulación peribronquiolar y perivascular de células). (7)

Un hecho importante es que muchas de las lesiones pulmonares resultantes de una infección no complicada por *Mycoplasma hyopneumoniae* pueden sanar y regenerar con el tiempo. (67)

5.4.6 INMUNIDAD

Muchos cerdos experimentan la primera infección con *Mycoplasma hyopneumoniae* a una edad temprana; los cerdos se infectan sin mostrar signos en primera instancia. La protección ofrecida por anticuerpos maternos son capaces de mantener baja incidencia a una edad temprana. (67)

Cuando la protección materna declina y bajo la influencia negativa del estrés y factores de manejo, los cerdos entonces desarrollan la enfermedad. Los cerdos comúnmente sobreviven a la enfermedad y desarrollan una firme inmunidad contra *Mycoplasma hyopneumoniae*. (67)

Como se mencionó anteriormente, las micoplasmosis suelen dejar una sólida inmunidad. La inmunidad es local debida a anticuerpos secretores (IgG e IgA), con participación de la inmunidad de tipo celular. Los primeros anticuerpos en aparecer son IgM e IgA, seguidos de IgG. (6, 12, 51, 73)

La respuesta inmune humoral a la infección experimental de *Mycoplasma hyopneumoniae* se refleja en la tos y las lesiones neumónicas. La seroconversión aparece 9 días después de la tos. (69)

Los micoplasmas causan también una serie de inmunoreacciones que conducen a alteraciones inmunopatológicas. La formación de complejos inmunitarios provoca reacciones inflamatorias y la acumulación masiva de linfocitos. (51)

Por otro lado, los microorganismos tratan de eludir, de formas diversas, la inmunoreacción del huésped. Su localización superficial los hace ya difícilmente accesibles a los mecanismos de la inmunidad; además gozan de una buena protección a causa de su resistencia a la fagocitosis. (29, 51)

5.4.7 SIGNOS CLÍNICOS

Los signos clínicos causados por *Mycoplasma hyopneumoniae* no son muy específicos. Los primeros signos comúnmente ocurren a las 3-10 semanas de edad después del destete, pero la mayoría no desarrollará una infección hasta 3-6 meses durante el periodo de finalización. (67)

Se han descrito dos formas de la enfermedad: una aguda relativamente rara, en la que

pueden aparecer brotes graves en piaras susceptibles cuando llega la infección por vez primera. En estos casos enferman animales de todas las edades, y las cifras de morbilidad alcanzan 100%. Es característica la aparición de signos respiratorios agudos acompañados de tos, con fiebre o sin ella, anorexia y puede haber mortalidad en lechones y adultos después de que se presentan los accesos de tos. La evolución es de 3 semanas aproximadamente, después de las cuales se da paso a la forma crónica, la más común. (8)

La forma crónica o enzoótica de la enfermedad se observa en los hatos convencionales, manifiesta síntomas no específicos. La morbilidad es alta, pero la mortalidad es baja. En muchos casos son aparentes algunos signos de la enfermedad. Pueden verse afectados lechones de 3 a 10 semanas de edad y los signos clínicos pueden observarse en lechones lactantes; pero más frecuentemente se manifiestan después del destete y en período de crecimiento. El principio de las anomalías clínicas es insidioso, se presenta una diarrea transitoria y la tos es la manifestación principal, aún cuando pueden observarse estornudos en lechones, puede haber una fiebre ligera. (8, 67)

La tos es más notable en la actividad inicial de la mañana y a la hora de alimentarse. La tos puede forzarse al hacerlos caminar y ocurre con mayor frecuencia en el período inmediatamente posterior a dicho ejercicio, es posible que sólo unos cuantos animales del grupo muestren afecciones clínicas, pero después la incidencia aumenta. El padecimiento desaparece en 2 ó 3 semanas o persiste durante todo el período de crecimiento. Es característica la tos seca, de difícil expulsión y repetitiva. Pocas veces se observa alteración de los movimientos respiratorios, subsiguientemente disminuye la tasa de crecimiento, la cual variará entre un cerdo y otro, por lo que es común encontrar que dentro del grupo el tamaño de los animales es desigual. Algunos cerdos afectados con la forma crónica pueden llegar a sufrir neumonía aguda por invasión secundaria de *pasteurella* u otros microorganismos. (8)

El efecto "puerta de entrada" que la infección por *Mycoplasma hyopneumoniae* causa, incrementa la susceptibilidad del tracto respiratorio a las infecciones secundarias y puede conducir al desarrollo de MIRD, enfermedad respiratoria inducida por micoplasma. (67)

Los signos clínicos pueden agravarse después como MIRD, ambos incrementan la severidad y duración de los problemas de la enfermedad respiratoria. Estos efectos combinados son los que hacen a la neumonía enzoótica devastadora. (67)

La enfermedad en su forma clínica se hace menos evidente al avanzar la edad, y pocas veces se encuentra en la cerda, aunque a menudo se descubre que las hembras jóvenes albergan *Mycoplasma hyopneumoniae*. (8, 38, 73)

5.4.8 LESIONES

Macroscópicas:

El conjunto de lesiones en los pulmones de cerdos con neumonía enzoótica consiste en áreas de consolidación púrpura a gris pardusco. Las lesiones generalmente aparecen bilateralmente en la porción ventral de los lóbulos apical y cardíaco, el lóbulo intermedio y

la porción anterior del lóbulo diafragmático de los pulmones. (8, 38, 67)

En conjunto, la apariencia de los lóbulos afectados es la de un pulmón atelectásico y su tamaño igual o más reducido que el de un pulmón normal, y su color es de rojo oscuro a púrpura. Hay una clara delimitación entre el tejido sano y el tejido del pulmón dañado. Cuando se incide el pulmón afectado, su consistencia es carnosa no muy firme. Generalmente se presenta un exudado catarral en las vías aéreas. Los linfonodos bronquial y mediastínico se encuentran agrandados. (8, 67, 78)

Microscópicas:

Al exámen microscópico se aprecia una neumonía catarral broncointersticial asociada con prominentes infiltraciones linfocitarias peribronquiales en etapas crónicas de la infección. En casos severos los acúmulos linfoides pueden presentar centros germinales y atrofian el músculo liso peribronquial, causando además estrechamiento del lumen bronquial. El epitelio bronquial presenta una marcada hiperplasia con pérdida de cilios, aunado a una dilatación de las glándulas de la submucosa, lo que produce un abundante exudado mucoso. Los septos alveolares se encuentran engrosados debido a infiltraciones de linfocitos y células plasmáticas. En el espacio alveolar se encuentra un exudado compuesto de macrófagos y algunos neutrófilos, linfocitos y células plasmáticas. Con frecuencia los casos de micoplasmosis porcina se complican con infecciones bacterianas secundarias como *Pasteurella multocida* o (*Haemophilus Actinobacillus pleuropneumoniae*, con lo cual la neumonía se convierte en un proceso predominantemente supurativo o fibrinoso. (78)

Un estudio reporta que, los pulmones infectados por *Mycoplasma hyopneumoniae* a las 2 a 4 semanas postinoculación, con la tinción UEA-1, se presentó un exudado serofibrinoso y fibrinosupurativo, en bronquios, bronquiolos y alvéolos. A las 4 semanas postinoculación, la mayor parte de secciones de pulmón tuvieron pequeñas cantidades de exudado intralveolar y pequeñas áreas de epitelio bronquiolar pseudoestratificado; rodeado por infiltrado moderado de linfocitos. A las 6 semanas postinoculación aproximadamente 75-90% de los bronquios son delineados por epitelio pseudoestratificado en un patrón segmental o difuso. Esas vías aéreas también han marcado infiltraciones de linfocitos con células plasmáticas y macrófagos ocasionalmente, esparcidas en el estrato adventicio y también en agregados nodulares densos. Menor número de linfocitos extendidos en la lámina propia. En muchos bronquiolos la tinción UEA-1 de áreas cuboidales y pseudoestratificadas fueron asociados con infiltrados de linfocitos y pocas células plasmáticas adventicias. (2)

5.4.9 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de neumonía enzoótica se hace normalmente a nivel de la granja y del animal. Los criterios más usados son:

- 1- La presencia de neumonía crónica en la granja, principalmente en cerdos de engorda, un crecimiento desigual, baja eficiencia en la conversión alimenticia pero sin mortalidad.
- 2- Signos clínicos en cerdos de 2 a 4 meses de edad, de tos seca no productiva sin fiebre o problemas respiratorios.
- 3- Hallazgos post-mortem en lóbulos anteriores del pulmón tipo de neumonía aguda. Los hallazgos histológicos no son específicos, pero ayudan a confirmar el diagnóstico.

4- Es esencial en el diagnóstico confirmar mediante pruebas de laboratorio, principalmente en proyectos de monitoreo.

El diagnóstico de neumonía enzoótica por *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos puede dificultarse en algunos casos. Para hacer un buen diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae* y una mejor evaluación de la enfermedad, se recomienda realizar la combinación de métodos incluyendo la historia clínica, la evaluación posmortem, exámen bacteriológico del tejido pulmonar y serología. (4, 64)

Dentro de los métodos de diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae*, el más importante es el aislamiento, pero muchas veces es tardado, difícil, por lo que se ha recurrido a utilizar procedimientos serológicos. (42)

Los métodos serológicos tradicionales de las infecciones micoplásmicas como son fijación de complemento, inhibición de la hemoaglutinación e inhibición metabólica han sido extensamente utilizadas para diagnosticar y confirmar casos clínicos de la enfermedad; las dos primeras han mostrado problemas en la sensibilidad y especificidad, lo que limita su valor como herramientas epidemiológicas. (41, 64)

El resultado al examen de las lesiones pulmonares puede no ser muy notable, lo que nos va a llevar al cultivo y aislamiento de *Mycoplasma hyopneumoniae*, el cual muchas veces es difícil y complicado, por lo que se precisa poner en práctica pruebas para la detección de micoplasma en el pulmón, utilizando en cortes de pulmón las técnicas de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa. (64)

También se han desarrollado pruebas disponibles para el diagnóstico serológico de la infección, las cuales incluyen: fijación de complemento, aglutinación en látex, precipitación en gel agar, contra-immunoelectroforesis, hemaglutinación indirecta y prueba de inmunoabsorción ligada a enzimas. Más recientemente: reacción en cadena de la polimerasa, sondas génicas. Por lo anterior, se deben complementar unas pruebas con otras para el diagnóstico más preciso de la enfermedad. (11, 73, 81)

5.4.10 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

La necropsia selectiva y el examen sistemático de laboratorio suelen conducir al diagnóstico.

La neumonía enzoótica porcina, con invasión secundaria o sin ella, es la infección respiratoria más frecuente en los cerdos.

El brote agudo puede confundirse con influenza porcina, pero esta enfermedad es mucho menos frecuente y se caracteriza por curso breve con estornudo y dolores musculares, y los signos generales son más propios de una infección de las vías respiratorias superiores que de neumonía, además se encuentra siempre *Haemophilus suis* y la infestación por vermes pulmonares. En casos de infestación por vermes pulmonares no complicadas (especies de *Metastrongylus*) pueden observarse signos respiratorios en porcinos. Sin embargo en la necropsia es más manifiesta la bronconeumonía en placas en la parte dorsal de los lóbulos diafragmáticos, y es posible además identificar los vermes. La pleuroneumonía contagiosa de los porcinos por *Actinobacillus pleuropneumoniae* es mucho más aguda y produce

mortalidad más elevada. El otro problema, más difícil, es formular un diagnóstico etiológico definitivo respecto a la presencia de la forma subclínica de la neumonía enzoótica por *M. hyopneumoniae*, o más difícil certificar la ausencia de infección en un grupo de porcinos. Hay pruebas de que la infección puede persistir en una piara durante un periodo sin manifestaciones serológicas, clínicas ni patológicas. (8, 38)

5.5 PRUEBA DE INMUNOPEROXIDASA DIRECTA

5.5.1 Antecedentes

Las principales técnicas utilizadas en inmunquímica son dos, a saber: inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa. (20)

La introducción de la técnica de inmunofluorescencia en 1950, fue el mejor avance en inmunohistoquímica. (13)

Las técnicas de la inmunofluorescencia basadas en la conjugación química de los anticuerpos con fluorocromos han persistido durante casi 30 años con gran utilidad en el estudio de diversas enfermedades del hombre y los animales. (46)

Posteriormente se estableció que la técnica tiene un número de limitaciones: El uso de microscopio de inmunofluorescencia para observar los resultados; al observar secciones de tejido fijados, la no visualización de la arquitectura del tejido; la preparación final no es permanente, aunque hay disponibles técnicas que inhiben el desvanecimiento de la tinción con fluorocromo. (13)

No obstante por la facilidad de la técnica y la habilidad de los marcadores fluorescentes para visualizar claramente a muy bajas concentraciones, continúa siendo popular, particularmente cuando se observan estructuras individuales. (13)

En la búsqueda de un marcador alternativo para vencer las desventajas ya mencionadas; en la década de los 60's comenzaron estudios relacionados con la utilización de enzimas como marcadores de anticuerpos o de antígenos lo que ha provocado que surjan numerosos métodos inmunoenzimáticos que tienden a suplir, o incluso a reemplazar cada vez más, los métodos inmunológicos que utilizan otros marcadores como la fluorescencia o los radioisótopos. algunas enzimas fueron elegidas por ser un sustituto ideal, particularmente la peroxidasa de rábano. Esta enzima es utilizada histoquímicamente por producir intensos precipitados coloridos permanentes que pueden observarse utilizando microscopio de luz convencional. Casi todos estos precipitados son insolubles de esta manera permiten hacer preparaciones permanentes. (13, 46, 74)

Otra ventaja es que los procedimientos de inmunoperoxidasa permiten el uso de la microscopía inmunoeléctronica, y de esta forma los reactivos pueden emplearse tanto en la microscopía óptica como en la electrónica. La técnica puede ser usada junto a un procedimiento histológico de rutina, es efectiva para el diagnóstico patológico de la

enfermedad de Aujeszky. Los resultados obtenidos por la tinción de inmunoperoxidasa indirecta confirman las primeras observaciones por microscopía electrónica. (37, 45, 46)

Estos métodos inmunoenzimáticos demostraron una mayor sensibilidad en la identificación de antígenos virales, bacterianos o celulares; el uso de la técnica de inmunoperoxidasa ofrece una mayor capacidad para identificar elementos micóticos en infecciones discretas o iniciales; además de permitir una reacción permanente en tejidos fijados y embebidos en medios de inclusión, mientras que las estructuras se definen de manera similar que con las técnicas convencionales de histopatología y solo basta el uso de un microscopio óptico. (46, 79)

Los principios básicos de estos procedimientos son los mismos que rigen las técnicas de inmunofluorescencia, e inmunoperoxidasa, a saber: reacción de un anticuerpo (o de un antígeno) acoplado de forma covalente a una enzima con un antígeno (o un anticuerpo) inmovilizado, (es decir, naturalmente asociado a tejidos o artificialmente fijado sobre soportes), después detección de la actividad de la enzima con ayuda de sustratos específicos. De ésta forma se pueden distinguir dos grupos de métodos inmunoenzimáticos: los métodos de dosificación cuantitativa y los métodos de visualización del complejo antígeno-anticuerpo-enzima, ya sea en los tejidos o sobre las improntas de proteínas en una lámina de nitrocelulosa. (74)

Las técnicas inmunoenzimáticas utilizan principalmente anticuerpos marcados con enzimas para localizar los constituyentes presentes en los tejidos, pero la detección de la coloración citoquímica específica de la enzima utilizada como marcador reemplaza la detección de la fluorescencia. Estos métodos emplean un procedimiento directo, o indirecto; en el primer método, que es el que nos ocupa, el anticuerpo utilizado para detectar un antígeno está acoplado a la enzima. Y se utiliza casi exclusivamente IgG como anticuerpo para preparar el conjugado. (74)

Las principales desventajas con las técnicas inmunoenzimáticas son: Que algunos métodos requieren más pasos que las técnicas de fluorescencia para incrementar la sensibilidad; es necesario bloquear la peroxidasa endógena cuando se utiliza peroxidasa de rábano como marcador; el sustrato más popular en la técnica de visualización histoquímica de peroxidasa es la diaminobencidina (DAB) que inicialmente se pensaba que era carcinogénica, no obstante reportes recientes sugieren que esto no es muy cierto. (13)

Este método, como el de inmunofluorescencia, necesita una buena conservación del tejido de manera que la localización del antígeno sea preservada así como sus propiedades antigénicas, lo que requiere una fijación apropiada del antígeno investigado o del tejido. (74)

Se obtienen buenos resultados con los fijadores deshidratantes, por ejemplo, el etanol y la acetona. Las enzimas utilizadas son aquellas para las que existen sustratos específicos que dan productos insolubles y coloreados, principalmente la peroxidasa, la fosfatasa alcalina y la glucosa oxidasa. (74)

VI OBJETIVOS

6.1 JUSTIFICACION

Se conocen varios factores predisponentes o causantes directos de las neumonías, las cuales se convierten en una de las situaciones que más problemas causan en la producción de una granja porcina. La principal repercusión es de orden económico, tanto por los animales que se mueren como por los que quedan como enfermos crónicos (retrasados), la pérdida de peso en los que no se murieron pero sí estuvieron enfermos, y además el gasto en medicamentos, tanto inyectados como en el agua de bebida y en el alimento, la mano de obra, el costo del veterinario.

En el diagnóstico de neumonía enzoótica de los cerdos se considera el aislamiento de *Mycoplasma hyopneumoniae*, lo cual resulta muy difícil, debido a las características del microorganismo, así mismo, como la bioquímica de estas bacterias es irregular, habitualmente se identifican por técnicas serológicas e inmunológicas, siendo las más comunes la inhibición de crecimiento, inmunofluorescencia y ELISA Tween 20.

Lo anterior nos lleva a considerar los métodos de diagnóstico más eficaces en cuanto a sensibilidad y especificidad en el diagnóstico oportuno de la enfermedad a nivel de laboratorio, y poder así implementarlos.

La prueba de inmunofluorescencia directa tiene las ventajas de ser rápida y fácil de desarrollar, económica y específica, no obstante sus desventajas: no visualización de la arquitectura, la preparación final no es permanente.

Una prueba recientemente desarrollada, para el diagnóstico de enfermedades infecciosas es la inmunoperoxidasa; esta prueba ofrece las siguientes ventajas: alta especificidad y sensibilidad, es un método rápido y puede ser vista al microscopio óptico.

6.2 HIPÓTESIS

La sensibilidad y especificidad de las pruebas de inmunofluorescencia directa e inmunoperoxidasa directa son similares a inhibición de crecimiento y aislamiento para utilizarlas en forma alternativa como método de diagnóstico en la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae* en la neumonía enzoótica de los cerdos.

6.3 OBJETIVO GENERAL

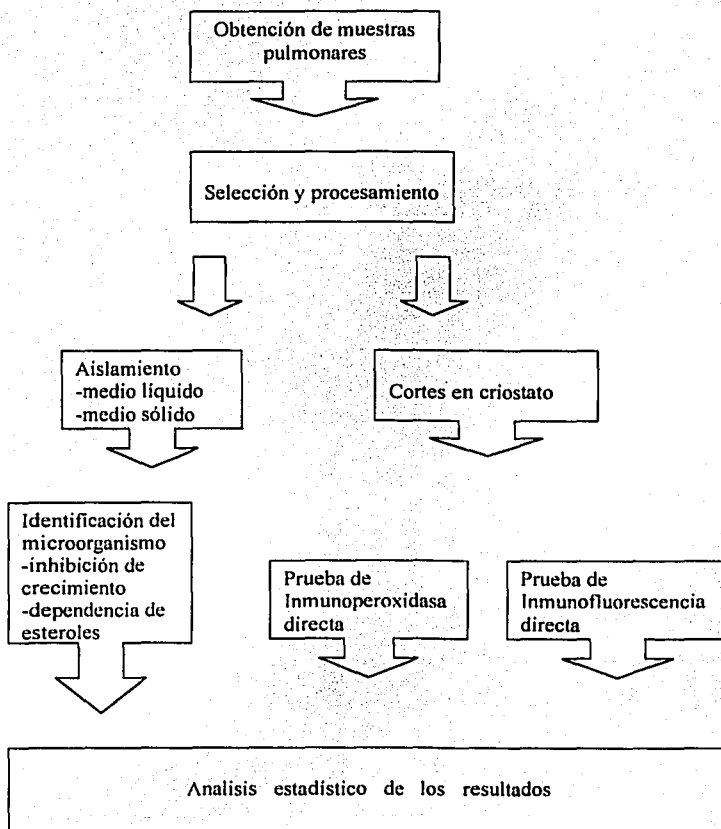
Implementar la técnica de inmunoperoxidasa directa y la técnica de inmunofluorescencia directa, en tejido pulmonar de cerdo, con lesiones sugestivas de la infección por *Mycoplasma hyopneumoniae*, y poder así evaluar y comparar su efectividad como método de diagnóstico de neumonía enzoótica de los cerdos.

6.4 OBJETIVOS PARTICULARES

- 6.4.1 Obtención y selección de las muestras pulmonares
- 6.4.2 Aislamiento e identificación de *Mycoplasma hyopneumoniae* a partir de pulmones de cerdos en casos clínicos
- 6.4.3 Titulación de los sueros y los conjugados empleados en la prueba de inmunoperoxidasa directa.
- 6.4.4 Implementar la técnica de cortes en criostato de los pulmones con lesiones sugestivas de la enfermedad; con la finalidad de realizar las pruebas de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa directas.
- 6.4.5 Estandarización de las pruebas de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa directas.
- 6.4.6 Establecer la correlación entre ambas pruebas mediante el análisis estadístico de los resultados, empleando la prueba X².
- 6.4.7 Determinar la sensibilidad y especificidad de las pruebas de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa directas.

Figura 3

DIAGRAMA GENERAL DEL EXPERIMENTO



VII MATERIAL Y METODOS (16, 18, 19, 38, 45, 49, 55, 62, 74)

7.1 OBTENCION DE MUESTRAS PULMONARES

Para la realización de las pruebas se utilizaron 56 muestras pulmonares, de cerdos provenientes de granjas de diferentes estados del país: Nuevo León, Puebla, México, con problemas respiratorios, pertenecientes a lechones en etapa de destete, que presentaban lesiones sugestivas de neumonía enzoótica, de las cuales, unas se conservaron en crioprotector a -20°C y sus correspondientes se utilizaron para el cultivo y aislamiento de *Mycoplasma hyopneumoniae*, manteniéndose para tal efecto congeladas a -20°C .

7.2 CONTROLES

Como control negativo se utilizó un pulmón de cerdo de aproximadamente 3 meses de edad, que no presentó lesiones pulmonares, no se aisló microorganismo alguno y fue negativo a la prueba de inmunofluorescencia directa, el cual procedía de una granja libre de enfermedades respiratorias.

Como controles positivos, se utilizaron un pulmón de campo y otro pulmón proveniente de un cerdo, el cual fue inoculado previamente y sacrificado a las 10 semanas de la inoculación con la cepa 194 de *Mycoplasma hyopneumoniae*; ambos resultaron positivos al aislamiento de *Mycoplasma hyopneumoniae*, a las pruebas de inhibición de crecimiento (con el antisuero de *M. hyopneumoniae*), e inmunofluorescencia directa.

7.3 CULTIVO Y AISLAMIENTO

- 1-De las muestras de pulmón de cerdo con lesiones sugestivas de neumonía enzoótica, se esterilizó la superficie externa y el área de corte con espátula al rojo vivo.
- 2-Se cortó un trozo de pulmón de 1cm^3 aproximadamente, procurando abarcar bronquio y bronquiolo.
- 3-Se maceró en un Ten Broeck estéril adicionando 3 ml de medio de cultivo líquido de Friis estéril hasta obtener una suspensión.
- 4-Se decantó la suspensión en tubos estériles para centrifugar a 5 000 xg durante 15 minutos.
- 5-Del sobrenadante se tomaron 0.3 ml efectuando diluciones logarítmicas hasta 10^{-3} , quedando una cantidad final de 2.7 ml en cada tubo.
- 6-Se incubaron a 37°C durante una semana revisando diariamente posibles contaminaciones (cambio de color amarillo).
- 7-De los tubos no contaminados se tomó un inóculo con asa de platino y se realizaron siembras en medio sólido, se incubaron a 37°C con atmósfera de CO_2 al 5% mediante el método de velobiosis durante una semana revisando diariamente posibles contaminaciones.
- 8-Los tubos donde se observaron posibles contaminaciones se procedió a realizar

- la purificación mediante el uso de un filtro Swinney (0.45µm) para la obtención del microorganismo de interés y realizar los siguientes cultivos
- 9-Los cultivos en medio líquido en donde se sospechó el crecimiento de micoplasmas se congelaron a - 20°C.
 - 10-De los cultivos en medio sólido donde hubo crecimiento de micoplasmas se realizó una serie de subcultivos para mantener viables a las cepas, y su posterior resiembra para obtener colonias puras, con la finalidad de efectuar las pruebas de identificación.

7.4 PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN DEL MICOPLASMA

Los procedimientos de identificación se iniciaron después de 7 a 15 días, tiempo en el que el cultivo se volvió ácido, ya que el crecimiento de *Mycoplasma hyopneumoniae* se caracteriza por pequeña o alguna turbidez y un cambio de pH (el medio cambia de color salmón a amarillo)

7.4.1 Prueba de dependencia de esteroides

Se utilizó solución de digitonina al 1.5% en solución alcohólica al 95%, se esterilizó por filtración con membrana de 0.22 µ, se mantuvo a 4°C

7.4.2 Prueba de inhibición de crecimiento

7.4.2.1 Cepas de referencia

Las cepas de referencia, utilizadas en esta prueba fueron las siguientes:

Mycoplasma hyopneumoniae - 194. Proporcionada por el Dr. Ross de la Universidad de Iowa

Mycoplasma flocculare - MS42. Proporcionada por el Dr Pijoan de la Universidad de Minesota

Mycoplasma hyorhinis - ATCC. Donada por el NVSL, Iowa.

Con las cuales se evaluaron los sueros hiperinmunes, en la prueba de inhibición de crecimiento; los aislamientos de los pulmones controles y las muestras problema.

7.4.2.2 Sueros hiperinmunes.

Para la prueba de inhibición de crecimiento se utilizaron antisueros contra *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* y *M. flocculare*; donados por el N.V.S.L. Iowa.

El procedimiento para ambas pruebas (IC y dep. de esteroides) fue el siguiente: se inocularon los cultivos de micoplasmas en medio sólido empleando hisopos, el sembrado fué en tres direcciones tratando de obtener un crecimiento uniforme, se dejó secar junto al mechero durante 15 minutos, ya seco, se colocaron sensidiscos de papel filtro de 5 mm de diámetro estériles impregnados con una gota de solución de digitonina, y los antisueros

específicos de *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, *M. flocculare*, impidiendo que se tocaran entre sí, la caja se dejó incubar aproximadamente una semana a 37°C. Se realizó la lectura, considerando como positivo a la prueba cuando la solución (digitonina, alcohol, antisuero) impedía el crecimiento del microorganismo en cuestión para cada caso, observándose un halo de inhibición alrededor del sensidisco de aproximadamente 5 milímetros de diámetro. Como controles negativos se utilizaron suero caprino inactivado y solución alcohólica al 95%. Los controles positivos lo constituyeron el crecimiento de cada una de las cepas sin solución.

7.5 PRUEBA DE INMUNOPEROXIDASA DIRECTA.

Para el desarrollo de la prueba, se obtuvo un antisuero contra *M. hyopneumoniae*, de un cerdo SPF. Mediante un riguroso protocolo de inmunización con un inmunógeno específico. A partir del antisuero se obtuvo una fracción purificada de inmunoglobulina G de acuerdo a la técnica descrita por Sánchez V. (1990).

El conjugado empleado en la prueba denominado CHAK-EK ha sido elaborado en la Facultad de Estudios Superiores Cautitlán, a una dilución óptima de trabajo 1:200, obtenida por cuadrado de ajedrez, sobre una microplaca

7.5.1 Titulación del conjugado

La titulación se hizo en dos partes, la primera con células de *M. hyopneumoniae* y la segunda en cortes de tejido pulmonar.

En el primer caso se empleó el método de diluciones dobles doble dimensional (método de ajedrez) en una placa de 12 carriles, como se explica a continuación:

- Se agregaron 100 microlitros de solución de sensibilización (paquete de células)
- A cada pozo de la columna 1 se agregó 100 microlitros de antígeno tween 20 y se hacen diluciones dobles de la columna 1 a la 12
- Se dejó fijar toda la noche a 4° C
- Se retiró la anterior solución, por golpeteo de la microplaca
- Se agregó 100 microlitros de TBSE
- Al conjugado liofilizado (100) microlitros se le agregó 2.4 mililitros de TBSE, se depositaron 100 microlitros de lo anterior a los pozos de la fila A
- Se realizaron diluciones dobles de la fila A a la G, la H quedó como control
- Se incubó una hora a 37° C
- Se realizaron dos lavados con TBSE
- Se aplicó 100 microlitros de revelador ABTS, en cada pozo
- Se dejaron incubar 15 minutos a temperatura ambiente
- Se aplicó 100 microlitros de solución stop a cada pozo
- Se realizó la lectura en el espectrofotómetro a una absorbancia de 405 nanómetros.

En el segundo caso se utilizaron cortes de pulmón obtenidos en microtomo crióstato, como se describe en el cuadro 4.

Cuadro 4.

CONTROLES UTILIZADOS EN LA TITULACION DE LA PRUEBA DE INMUNOPEROXIDASA DIRECTA .

Tipo de muestra	Aislamiento de <i>M.h.</i>	Reacción
Controles negativos:		
Pulmón fetal	-	-
Pulmón normal	-	-
Pulmón con lesiones de N.E. sin conjugado.*	+	-
Pulmón con lesiones de N.E. sin DAB.**	+	-
Controles positivos:		
Pulmón con lesiones de N.E. caso clínico, positivo a IFD.	+	+

*Sólo con diaminobencidina (DAB) para establecer que no existiera reacción inespecífica por parte de DAB.

** Sólo con conjugado para establecer que no existiera reacción negativa por parte del conjugado.

7.5.2 Procesamiento de las muestras

- 1-De las muestras de pulmón de cerdo con lesiones sugestivas de neumonía enzoótica, se esterilizó la superficie externa y el área de corte con espátula al rojo vivo.
- 2-Se cortó un trozo de pulmón de 1cm³ aproximadamente, procurando abarcar bronquio y bronquiolo.
- 3-Las muestras pulmonares fueron embebidas en un crioprotector y congeladas a -70°C.
- 5-Se realizaron cortes de 8 micras de grosor en el microtomo criostato a -20°C.
- 6-Los cortes se colocaron en portaobjetos desengrasados, se secaron al aire unos segundos.
- 7-Se fijaron en acetona fría (-20°C) durante 10 minutos.
- 8-Los cortes se colocaron en metanol absoluto con 0.1% de H₂O₂ por 20 min. a temperatura ambiente, con la finalidad de destruir la peroxidasa endógena.
- 9-Se hicieron tres lavados de las laminillas con TBSE (de 5 min. cada uno, con agitación constante).
- 10-Se agregó a la muestra el conjugado de peroxidasa, incubandose 1 hora. A 37°C, en cámara húmeda.
- 11-Se realizaron lavados en condiciones semejantes a los anteriores.
- 12-Se colocó la solución reveladora de DAB(*) de 30 a 45 min., dependiendo de la reacción colorida.
- 13-Se lavó con agua destilada.
- 14-Se observó al microscopio óptico.

(*) La solución reveladora se preparó mediante el uso de la diaminobencidina (DAB Sigma L) como sustrato y fue considerada la siguiente relación para su elaboración: 5 mg de DAB por cada 10 ml de Tris HCl al 0.1M pH 7.6, añadiendo 0.2 ml de H₂O₂ al 3% previamente a colocar la solución.

7.6 PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA.

Para esta prueba se utilizó el conjugado de inmunofluorescencia denominado BEN-EK, el cual ha sido elaborado en la Facultad de Estudios Superiores Cautitlán a una dilución de trabajo 1:16.

7.6.1 Procesamiento de las muestras

- 1- Se seleccionó la muestra, se esterilizó la superficie externa y el área de corte con espátula al rojo vivo.
- 2- Se cortó un trozo de pulmón de 1cm³ aproximadamente, se procuró abarcar bronquio y bronquiolo.
- 3- Las muestras pulmonares fueron embebidas en un crioprotector y congeladas a -70°C.
- 4- Se realizaron cortes de 8 micras de grosor en el microtomo criostato a -20°C.
- 5- Los cortes se colocaron en portaobjetos desengrasado, se secaron al aire unos segundos
- 6- Se fijaron en acetona fría (-20°C) durante 10 minutos.
- 7- Se colocó sobre la muestra 1 gota de conjugado de fluorescencia más 4 gotas de PBS, incubándose 30 minutos a 37°C, en cámara húmeda.
- 8- Se hicieron tres lavados con PBS en agitación constante, de 5 minutos cada uno.
- 9- Se secaron las muestras y observaron en microscopio de fluorescencia (C2 WL con lámpara de Mg HB200 W/A; se utilizó un filtro de excitación azul, VG 12 y un filtro de barrera 50) a 420 nm de λ .

En la figura 4 se esquematiza el tipo de reacción que se lleva a cabo en el método inmunohisto(cito)químico directo.

7.7 Análisis estadístico

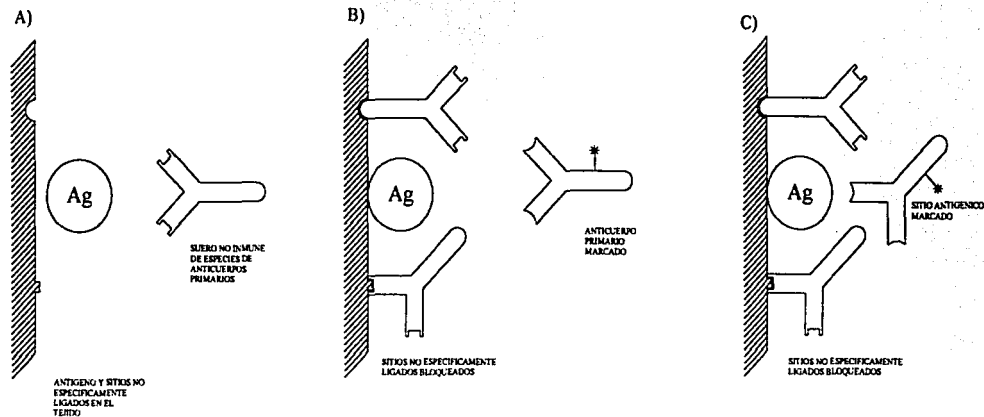
Se utilizó la prueba Ji cuadrada, corrección de Yates, entre IC e IFD y entre IC e IPD; a partir de tablas de contingencia 2 X 2, para comprobar la hipótesis planteada, representando IC en este caso a las poblaciones previamente determinadas.

7.8 Determinación de sensibilidad y especificidad

A partir de tablas de contingencia 2 X 2 se obtuvo la sensibilidad y la especificidad para las pruebas de IFD e IPD.

Figura 4

MÉTODO INMUNOHISTOQUÍMICO DIRECTO CON ANTICUERPO MARCADO



- A) En la primera etapa, sitios no específicos en la sección del tejido son bloqueados por la inmunoglobulina en suero normal de la misma especie que suministra el siguiente anticuerpo primario.
- B) El anticuerpo primario marcado se adiciona preferentemente a una concentración de saturación, el marcador puede ser una enzima, un fluorocromo: el principio es el mismo.
- C) El anticuerpo específico unido al antígeno. La unión es detectada por un método apropiado al marcador utilizado.

VIII RESULTADOS

Después de haber hecho una selección, se obtuvo un total de 56 muestras de las cuales, 41 de éstas fueron positivas al aislamiento del microorganismo y 15 negativas, al igual que en la prueba de inhibición del crecimiento, considerando el que resultaran positivas o no al crecimiento de *Mycoplasma hyopneumoniae*, y de las 15 negativas, 4 muestras fueron positivas a *Mycoplasma hyorhinis*.

8.1 Cultivo y aislamiento

Se observó que el crecimiento de *Mycoplasma hyopneumoniae* fue bastante lento, el cambio de pH se observó alrededor de los 5 o 6 días postincubación; en algunos este cambio se dio a los 14 días o más.

8.2 Controles

Al realizar las pruebas de inhibición de crecimiento y la prueba de dependencia de esteroides, se obtuvieron resultados que demuestran que tanto las muestras control como las cepas de referencia son confiables (cuadro 5). La identificación positiva que se obtuvo para la prueba de inhibición de crecimiento, como para la dependencia de esteroides, se dio en base a no observarse una multiplicación del microorganismo en una zona de 3-5 mm de diámetro a partir del sitio donde se aplicó el suero.

Cuadro 5

RESULTADOS DE LOS CONTROLES PULMONARES Y CEPAS DE REFERENCIA EN LAS PRUEBAS DE INHIBICION DE CRECIMIENTO Y DEPENDENCIA DE ESTEROLES.

Tipo de muestra		Inhibición de crecimiento			Dependencia de esteroides
		Suero anti <i>M. hyop.</i>	Suero anti <i>M. flocc.</i>	Suero anti <i>M. hyor.</i>	
Muestras pulmonares	Negativo -	-	-	-	-
	Positivo +	+	-	-	+
Cepas de referencia	<i>M. hyop.</i>	+	-	-	+
	<i>M. flocc.</i>	-	+	-	+
	<i>M. hyor.</i>	-	-	+	+

En el cuadro 6, se observa la relación de los resultados positivos y negativos entre las pruebas de aislamiento, inhibición de crecimiento, inmunoperoxidasa directa, e inmunofluorescencia directa.

En el cuadro 7, se muestran los resultados de las pruebas realizadas en las muestras pulmonares.

Donde, en aislamiento e inhibición de crecimiento, se obtuvo un porcentaje de 73.21% de positivos (41/56); 26.78% de negativos (15/56); en inmunoperoxidasa directa un 75% de resultados positivos (42/56) y 25% de negativos (14/56). En inmunofluorescencia directa se obtuvo 67.86% de positivos (38/56); 32.14% negativos (18/56).

El cuadro 8 muestra un resumen comparativo de las pruebas realizadas; donde 38 resultados fueron positivos y 14 negativos, en las pruebas de aislamiento, inhibición de crecimiento, inmunoperoxidasa directa, e inmunofluorescencia directa; 4 muestras no coincidieron en algún resultado. Dando un subtotal de 52 muestras, que coincidieron en los resultados de las cuatro pruebas, de un total de 56 muestras analizadas.

8.3 Inmunofluorescencia directa

En esta prueba 38 muestras fueron positivas y 18 negativas; se observó la localización del micoplasma a nivel del epitelio mucociliar bronquial, de color amarillo limón. Ver figura 6.

8.4 Inmunoperoxidasa directa

8.4.1 Titulación del conjugado

Se determinó que la concentración de proteína fue 88.75 microgramos por ml, una dilución de 1: 1536 y la cantidad mínima de antígeno detectada fue de 21.7 ng/ml.

Así mismo se determinó que la dilución recomendada para identificación de colonias fue de 1: 400 y 1: 200 en tejido.

En esta prueba, se obtuvo un total de 42 resultados positivos y 14 resultados negativos; se observa la localización del micoplasma a nivel del epitelio mucociliar bronquial, (corpúsculos de color café-rojizo). Ver figura 8 y 9.

Cuadro 6

RELACIÓN DE RESULTADOS POSITIVOS Y NEGATIVOS ENTRE LAS PRUEBAS DE AISLAMIENTO (Aislam.), INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO (IC), INMUNOFUORESCENCIA DIRECTA (IFD) E INMUNOPEROXIDASA DIRECTA (IPD), DE LAS 56 MUESTRAS ANALIZADAS.

No.	Aislam.	IC.	IFD.	IPD.	No.	Aislam.	IC.	IFD.	IPD.
1	+	+	+	+	29	+	+	+	+
2	+	+	+	+	30	+	+	+	+
3	-	-	-	-	31	+	+	+	+
4	-	-	-	-	32	+	+	-	+
5	+	+	+	+	33	+	+	+	+
6	+	+	+	+	34	+	+	+	+
7	-	-	-	-	35	+	+	+	+
8	-	-	-	-	36	+	+	+	+
9	+	+	-	+	37	+	+	+	+
10	+	+	+	+	38	+	+	+	+
11	-	-	-	-	39	+	+	+	+
12	-	-	-	-	40	+	+	+	+
13	-	-	-	+	41	-	-	-	-
14	+	+	+	+	42	+	+	+	+
15	+	+	+	+	43	+	+	+	+
16	+	+	+	+	44*	-	-	-	-
17	+	+	+	+	45	+	+	+	+
18	+	+	+	+	46	+	+	+	+
19	+	+	+	+	47	+	+	+	+
20	-	-	-	-	48	+	+	+	+
21	-	-	-	-	49	+	+	+	+
22	+	+	+	+	50	+	+	+	+
23	+	+	+	+	51	+	+	+	+
24	+	+	+	+	52**	-	-	-	-
25	-	-	-	-	53**	-	-	-	-
26	+	+	+	+	54**	-	-	-	-
27	+	+	+	+	55	+	+	+	+
28	+	+	-	-	56	+	+	+	+

*Muestra de campo con *Mycoplasma hyorhinis*.

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

Cuadro 7

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE AISLAMIENTO, INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO, INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA E INMUNOPEROXIDASA DIRECTA DE LAS 56 MUESTRAS PROBLEMA.

Pruebas:	Número de muestras:			Porcentaje:		
	positivas	Negativas	Total	positivas	Negativas	Total
Aislamiento	41	15	56	73.21%	26.79%	100%
Inhibición de crecimiento	41	15	56	73.21%	26.79%	100%
Inmunofluorescencia directa	38	18	56	67.86%	32.14%	100%
Inmunoperoxidasa directa	42	14	56	75%	25%	100%

Cuadro 8

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE AISLAMIENTO (Aislam.), INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO (IC), INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA (IFD) E INMUNOPEROXIDASA DIRECTA (IPD), DE LAS 56 MUESTRAS ANALIZADAS; RESUMEN COMPARATIVO.

	Aislam., IC, IFD., IPD.	Aislam., IC., IPD.	Aislam., IC, IFD.	IFD., IPD.
No. de muestras Positivas	38	2	0	0
No. de muestras Negativas	14	0	1	1
Subtotal	52	2	1	1

*Considerando los subtotales nos da un resultado total de 56 muestras procesadas



Figura 5. Prueba de inmunofluorescencia directa. Control negativo
Pulmón de cerdo, corte de 8μ de grosor (40x).



Figura 6. Prueba de inmunofluorescencia directa. Reacción positiva a la prueba.
Pulmón de cerdo, corte de 8μ de grosor. Se observan partículas fluorescentes
(microcolonias de *Mycoplasma hyopneumoniae*) sobre la superficie del epitelio
bronquial (40x).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

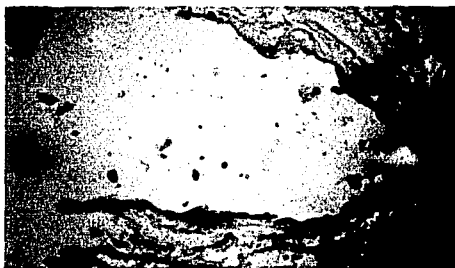


Figura 7. Prueba de inmunoperoxidasa directa. Reacción negativa a la prueba. Pulmón de cerdo, corte de 8μ de grosor (10x).

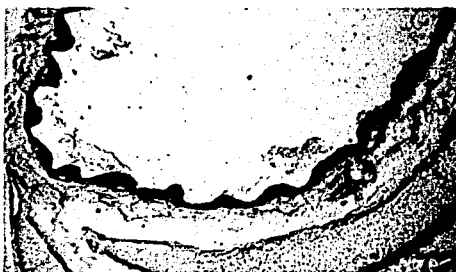


Figura 8. Prueba de inmunoperoxidasa directa. Reacción positiva a la prueba. Pulmón de cerdo, corte de 8μ de grosor. Se observan microcolonias de *Mycoplasma hyopneumoniae* sobre la superficie epitelial bronquial (coloración café-rojizo) (10x).

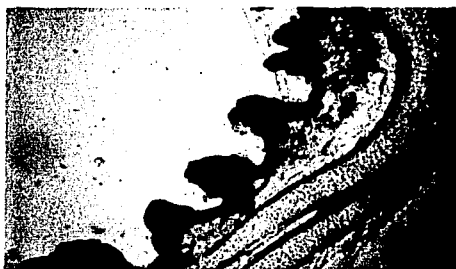


Figura 9. Prueba de inmunoperoxidasa directa. Reacción positiva a la prueba. Pulmón de cerdo, corte de 8μ de grosor. Se observan corpúsculos color café rojizo sobre la superficie del epitelio bronquial (40x).

8.5 Análisis estadístico

Con 1 g.l. y un nivel de confianza de 0.99. $J_i t = 6.635$

En IFD se obtuvo en $J_i c = 39.1225$

En IPD se obtuvo para $J_i c = 47.38$

Como $J_i c > J_i t$, se acepta la hipótesis, los resultados son similares para las pruebas.

8.6 Sensibilidad y especificidad de las pruebas

La sensibilidad y especificidad de las pruebas de IFD e IPD como se muestran en los cuadros 8 y 9 fue 92.68 %, 100 % 100 % y 93.33 %, respectivamente.

Cuadro 9

Arreglo de las frecuencias observadas, en una tabla de contingencia 2 X 2 para determinar la sensibilidad y la especificidad de la prueba de IPD :

Enfermedad presente	Enfermedad ausente
Positivos verdaderos (a) 41	Positivos falsos (b) 1
Negativos falsos (c) 0	Negativos verdaderos (d) 14

Sensibilidad = 0 %

Indice de negativos falsos = 4.76 %

Especificidad = 93.33 %

Indice de positivos falsos = 0 %

Validez = 98.21%

Valor predictivo positivo = 100 %

Valor predictivo negativo = 87.5 %

Cuadro 10

Arreglo de las frecuencias observadas, en una tabla de contingencia 2 X 2 para determinar la sensibilidad y la especificidad de la prueba de IFD :

	Enfermedad presente	Enfermedad ausente
Positivos verdaderos (a)	38	Positivos falsos (b) 0
Negativos falsos (c)	3	Negativos verdaderos (d) 15

Sensibilidad = 92.68 %

Indice de negativos falsos = 7.31 %

Especificidad = 100 %

Indice de positivos falsos = 0 %

Validez = 94.64%

Valor predictivo positivo = 100 %

Valor predictivo negativo = 83.33 %

IX DISCUSIÓN

En el país, el diagnóstico de la neumonía enzoótica porcina es muy escaso, el aislamiento no existe en forma rutinaria, la prueba ELISA es la más empleada; en otras enfermedades se requiere la confirmación de la presencia del antígeno mediante el aislamiento y la prueba de inmunofluorescencia; aún cuando la prueba de inmunofluorescencia es utilizada como prueba confirmatoria a nivel mundial, su uso no es rutinario; con la finalidad de subsanar lo anterior; en el presente trabajo, se pretende utilizar como pruebas confirmatorias el aislamiento del agente, la inhibición del crecimiento del microorganismo y el desarrollo de la prueba de inmunofluorescencia directa, para la evaluación de la prueba de inmunoperoxidasa directa, teniendo como antecedente la aplicación de prueba para identificar cultivos de *Mycoplasma hyopneumoniae*. (66)

El diagnóstico primario de la enfermedad está dado por la evidencia posmortem de infección, por ejemplo en presencia de lesiones macroscópicas y microscópicas típicas, en la visualización de *Mycoplasma hyopneumoniae* en tinción fluorescente de secciones pulmonares y/o en recuperación de cultivos de *M. hyopneumoniae* de tejido pulmonar. (4, 25)

Se pretendió utilizar como pruebas confirmatorias inmunofluorescencia directa e inmunoperoxidasa directa comparándolas con inhibición de crecimiento y aislamiento, al hallazgo de lesiones características macro y microscópicas o sugestivas en la identificación de *M. Hyopneumoniae*, a través de IFD y el aislamiento.

La selección de las muestras se hizo con base a la ubicación, coloración, estado de conservación del área de pulmón afectada, lo que permitió descartar las muestras en donde el estado de conservación de los tejidos, no fue el adecuado; se sugiere el uso de una solución, el polietilenglicol como crioprotector, el cual tiene como finalidad proteger el epitelio bronquiolar, manteniendo la integridad de los cilios, lugar donde colonizan los micoplasmas.

Así mismo, se pretendió el aislamiento y la identificación de *Mycoplasma hyopneumoniae* considerando las dificultades en el cultivo del microorganismo, lento crecimiento del agente ya sea por la ausencia de algunos constituyentes en el medio, o la contaminación con otros microorganismos; al no observarse crecimiento del microorganismo de interés algunas de las muestras procesadas originalmente, se descartaron después de varios pases y de intentar su purificación mediante el filtrado; lo que repercutió en la interpretación de las muestras problema al someterlas a las pruebas de caracterización bioquímica, lo que coincide con Sahu, donde, de los micoplasmas aislados en base a sus características culturales, morfología en tinción y cambios bioquímicos no se distinguieron de *Mycoplasma hyopneumoniae*, por lo que se recomienda la identificación de los agentes serológicamente, mediante el uso de antisueros de referencia. (4, 61)

Respecto a los resultados que arrojaron las muestras procesadas; se constituyeron dos grupos de animales, con la finalidad de hacer la interpretación de los resultados para la determinación de la sensibilidad y la especificidad de las pruebas de IFD e IPD : los

animales enfermos o infectados y los sanos; en el primer grupo se consideró la manifestación de los signos clínicos de la enfermedad, la presencia de lesiones características y por último el aislamiento del *Mycoplasma hyopneumoniae*, positivo a la prueba de inhibición de crecimiento, asegurando de esta forma la presencia de la enfermedad y disminuyendo la probabilidad de que un falso negativo se presentara. En el segundo grupo se consideraron aquellos animales que aún teniendo signos clínicos de la enfermedad, en las muestra pulmonares no se observó lesión alguna, o aquellas muestras pulmonares de las que no se aisló el microorganismo en cuestión o fué negativo a la prueba de inhibición de crecimiento.

El suero utilizado en la prueba de IPD fue evaluado ante las tres cepas de referencia mediante la prueba de IC, dando como resultado la identificación sólo de *M. hyopneumoniae* 194 con un diámetro de 5 mm, no presentando reacción cruzada con las otras dos cepas, considerando de esta forma que el antisuero fué específico al *M. hyopneumoniae*, disminuyendo la probabilidad de que se presentaran reacciones cruzadas.

Cuanto mayor sea la pureza de los anticuerpos mejores serán los índices de especificidad y se evitaría la presencia de falsos positivos, lo que nos indica que se requiere evaluar la purificación de los anticuerpos. (48)

En la prueba de IPD se dió la presencia de un resultado falso positivo, en este caso se trató de una muestra de pulmonar proveniente de un cerdo con los signos clínicos de la enfermedad y con lesión pulmonar, al aislamiento y a la prueba de IFD resultó negativa, probablemente el micoplasma se encontraba presente en pequeñas cantidades como para poder ser aislado; o que se haya perdido en el proceso de la técnica de inmunofluorescencia. (4)

Comparaciones sobre la eficiencia de la inmunofluorescencia indirecta y examen de cultivo como método de diagnóstico de neumonía enzoótica revelan que ninguna prueba por sí sola es confiable en el caso de los resultados negativos. (4, 25, 40, 42)

En la presente investigación los resultados de la evaluación de las pruebas de IPD e IFD con 100% y 92.68%; 93.33% y 100% de sensibilidad y especificidad respectivamente nos indican que ambas son elevadas.

Se menciona que la sensibilidad de la prueba de inmunoperoxidasa en la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae* en pulmones de cerdo es mayor que los métodos de inmunofluorescencia. Así mismo, el método de inmunoperoxidasa posee la misma especificidad que el de inmunofluorescencia para el marcado de anticuerpos específicos de diversos orígenes. (68)

En un estudio comparativo de cuatro diferentes métodos para la demostración de *Mycoplasma hyopneumoniae* en pulmones de cerdos inocuados experimentalmente; al determinar sensibilidad y especificidad, obtuvo una mejor sensibilidad en casos crónicos con el cultivo, comparando con los métodos de inmunofluorescencia, ELISA, PCR. Asimismo se observó una alta especificidad en los cuatro métodos. (68)

En un estudio comparativo de diferentes pruebas para el diagnóstico de laringotraqueítis infecciosa los porcentajes de sensibilidad para la prueba de inmunoperoxidasa, inmunofluorescencia indirecta, histopatología, reacción en cadena de la polimerasa y la hibridación, fueron del 100%, 93%, 7%, 27%, 0%, respectivamente. Los porcentajes de especificidad para las mismas pruebas fueron del 93%,

93%, 100%, 100% y 100% respectivamente; lo que nos demuestra que tanto la prueba de inmunoperoxidasa como la inmunofluorescencia indirecta fueron igualmente específicas, pero la primera fue más sensible que la segunda. Basados en estos resultados, la inmunoperoxidasa fue mejor que las otras pruebas. (1)

En general, los métodos de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa para la detección de antígeno de micoplasma en tejidos trabajan bien en animales que están altamente infectados. No obstante, esos métodos generalmente requieren un procesamiento especial del tejido y personal experimentado para la interpretación de los resultados. (46)

Los altos porcentajes de sensibilidad y especificidad observados nos indican que cualquiera de las dos técnicas (IFD e IPD) pueden utilizarse en forma individual o complementaria en sustitución de aislamiento e inhibición de crecimiento.

X CONCLUSIÓN

Considerando la alta sensibilidad y especificidad de las pruebas de IFD e IPD, y la dificultad del aislamiento del microorganismo por sus características, se recomienda utilizar las pruebas en forma individual o complementaria en sustitución de aislamiento e inhibición de crecimiento

El desarrollo de la prueba de inmunoperoxidasa directa es relativamente rápida y su lectura es simple. Puede ser útil en la localización de *Mycoplasma hyopneumoniae* en el pulmón, pudiendo ser una alternativa de la prueba de inmunofluorescencia.

A diferencia de ésta el producto final de la reacción de la peroxidasa y la diaminobencidina es más estable y puede ser visible con el uso de un microscopio óptico; lo que la hace más ventajosa que la prueba de inmunofluorescencia directa.

De estandarizarse la prueba, facilitaría el diagnóstico al evitar el uso del costoso equipo del microscopio de luz ultravioleta empleado en la prueba de inmunofluorescencia.

Por lo que la prueba de inmunoperoxidasa viene a ser una alternativa diagnóstica en nuestro país donde se carece del diagnóstico de la neumonía enzoótica.

XI ANEXOS

11.1 MEDIOS DE CULTIVO PARA MICOPLASMAS

11.1.1 MEDIOS LÍQUIDOS

	Infusión Cerebro Corazón*	5.0g
	PPLO Caldo (Difco)*	5.0g
(A)	Rojo de Fenol (sol. Al 0.2%)	7.0ml
	Agua Destilada	450.0ml

Esterilizar en autoclave a 121⁰ C y 15 libras de presión durante 15 minutos.
Mantener a una temperatura de 45 a 50⁰ C en baño María

Posteriormente se agregan en forma aséptica los siguientes componentes:

	Solución Salina Balanceada Modificada de Hanks	304.0ml
(B)	Extracto de Levadura	36.0ml
	Suero de Caballo	200.0ml
	Penicilina G	500 000UI

Se mezclan A y B, se distribuyen en tubos estériles (13 x 100 ml) con tapón de baquelita, conteniendo 3ml cada tubo.

11.1.2 MEDIOS SÓLIDOS

	Infusión Cerebro Corazón*	5.0g
	PPLO Caldo (Difco)*	5.0g
(A)	Rojo de Fenol (sol. Al 0.2%)	7.0ml
	Agar noble*	10.0g
	Agua Destilada	450.0ml

Esterilizar en autoclave a 121⁰ C y 15 libras de presión durante 15 minutos.
Mantener a una temperatura de 45 a 50⁰ C en baño María

Posteriormente se agregan en forma aséptica los siguientes componentes:

	Solución Salina Balanceada Modificada de Hanks	304.0ml
(B)	Extracto de Levadura	36.0ml
	Suero de Caballo	200.0ml
	Penicilina G	500 000UI

Se mezclan A y B, se distribuyen en cajas petri limpias y esterilizadas a razón de 30 ml por caja.

*Preparados a partir de medios basales comerciales:

PPLO caldo (Difco)
 Infusión cerebro corazón (Difco)
 Agar noble

Los medios se ajustan con Na OH 1N a un pH de 7.6.
 Cantidad suficiente para un litro de medio.

11.1.3 EXTRACTO DE LEVADURA

Suspender 50 gramos de levadura fresca de panadería en 100ml de KH_2PO_4 0.2 M
 Calentar a $80-85^\circ\text{C}$ durante 20 minutos
 Clarificar por filtración o por centrifugación
 Ajustar el pH a 7.6 con Na OH 1N
 Esterilizar por filtración
 Almacenar a -20°C

11.1.4 SUERO ESTERIL DE CABALLO

Se recolectó sangre mediante el corte de la vena yugular en equinos, se espera a que se retraiga el coágulo 24 horas, centrifugar el suero obtenido a 7 000 RPM filtrar en cartuchos de decreciente porosidad, posteriormente esterilizar en cartucho de 0.20 micras de poro, conservarlo a -20°C . Antes de su uso inactivar a 56°C durante 30 minutos, ó 60°C durante 15 minutos

11.1.5 SOLUCIÓN SALINA BALANCEADA MODIFICADA DE HANKS

Disolver en el siguiente orden:

Solución de Stock A

NaCl	80.0g
KCl	4.0g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.0g
Agua destilada	400.0ml
CaCl_2	1.4g
Agua destilada hasta	500.0ml

Solución de Stock B

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	1.5g
Agua destilada	400.0ml
KH_2PO_4	0.6g
Agua destilada hasta	500.0ml

Al momento de su uso 25ml de la solución stock A se mezclan con agua destilada hasta 400ml después se agregan 25ml de la solución stock B y se completa con agua destilada hasta 500ml.

11.2 PRUEBA DE INMUNOPEROXIDASA DIRECTA

11.2.1 ACOPLAMIENTO DE LA PEROXIDASA POR MEDIO DEL PERIODATO DE SODIO

Peroxidasa de rábano Horseradish Sigma tipo VI (EC 1.11.1.7) Lot 53H9588
Sefadex G25 fino

11.2.2 SOLUCION TBS

NaCl	8.5g
Trizma base	6.05g
EDTA	0.292g

Llevar a 800 ml y checar el pH

Si está alcalino, ajustar con HCl al 5 molar a Ph 7.4

Si está ácido ajustar con trizma base

Adicional 200 ml para completar 1000 ml

11.2.3 SOLUCION REGULADORA TRIS-HCl 1 M

Tris-(hidroximetil)-aminoetano	121g
Agua destilada	800 ml

Ajustar el pH al valor deseado, añadiendo una solución de HCl 6 N (aprox. 120 ml), para un pH 7.6

Completar el volumen a 1000

XII GLOSARIO

ABTS.-	2,2'-azino-bis(3-etilbenzoitcolina-6-ácido sulfónico)
Aislam.-	Aislamiento
ATCC.-	American Type Cells and Cultures, Células y Cultivos Tipo Americano.
c.b.p.-	Cuanto baste para
CD4+.-	Cluster of differentiation, grupo marcador para células cooperadoras
CD8+.-	Cluster of differentiation, grupo marcador para células citotóxicas
CMH.-	Complejo mayor de histocompatibilidad
DAB.-	Diaminobencidina
DNA.-	Acido desoxiribonucleico
E.D.T.A.-	Etilendinitrilotetracetato
ELISA.-	Ensayo inmunológico ligado a enzima
GC.-	Guanina-citocina
IC.-	Inhibición de crecimiento
IFD.-	Inmunofluorescencia directa
IPD.-	Inmunoperoxidasa directa
Ig.-	Inmunoglobulina
IL.-	Interleucina
N.E.-	Neumonía enzoótica
ng.-	Nanogramos
nm.-	Nanómetros
MDa.-	Microdalton
<i>M. flocc.</i>	<i>Mycoplasma flocculare</i>
<i>M. hyoph.-</i>	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>
<i>M. hyor.-</i>	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>
MIF.-	Factor inhibidor de la migración
MIRD.-	Enfermedad respiratoria inducida por micoplasma
NVSL.-	National Veterinary Services Laboratories, Laboratorios Nacionales de Servicios Veterinarios
PBS.-	Amortiguador de fosfatos
PCR.-	Reacción en cadena de la polimerasa
PPLO.-	Pleuropneumonía
PRRS.-	Síndrome disgenésico y respiratorio del cerdo
SPF.-	Libre de patógenos específicos
TBSE.-	Solución buffer trietanolamida + EDTA
TNF.-	Factor de necrosis tumoral
UEA-1.-	Ulex europaeus agglutinin I
xg.-	Gravedades
µm.-	Micrometro
µ.-	Micra

XIII BIBLIOGRAFIA

1. ABBAS, F.; ANDREASEN, J.R., 1996. Comparison of diagnostic test for infectious laryngotracheitis. Avian Diseases; vol. 40, no. 2; p. 290-295.
2. ACKERMANN, M.R.; DEBEY, M.C.; DEBEY B.M., 1991. Bronchiolar metaplasia and *Ulex europaeus agglutinin I* (UEA-I) Affinity in *Mycoplasma hyopneumoniae*-infected lungs of six pigs. Vet. Pathol.; vol. 28; p. 533-535.
3. ARMSTRONG, C.H.; FREEMAN, M.J.; SANDS-FREEMAN, L.; LÓPEZ-OSUNA, M.; YOUNG, T.; RUNNELS, L.J., 1983. Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay and the indirect hemagglutination and complement fixation test for detecting antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. Can. J. Comp. Med.; p. 464-470.
4. ARMSTRONG, C.H.; SCHEIDT, A.B.; THACKER, H.L.; RUNNELS, L.J.; FREEMAN, M.J. 1984. Evaluation of criteria for the postmortem diagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine. Can. J. Comp. Med. p. 278-281.
5. BALLOWS, A.; TRUPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; HEINZ, K. 1992. The prokaryotes, 2^o ed., Springer-Verlag, U.S.A., New York, p. 1937-1959
6. BIBERSTEIN, E.L.; ZEE Y.C., 1990 Review of veterinary microbiology; Blackwell, Scientific Publications, p. 213-220.
7. BLANCHARD, B.; VERA, M.M.; CAVALIER, A.; LANIC, L.J.; GOUNTANTON, J.; KOBISCH, M., 1992. Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with to *Mycoplasma hyopneumoniae*. Veterinary microbiology. 130 p. 329-341.
8. BLOOD, D.C.; RADOSTIS, O.M., 1992. Medicina veterinaria, 7^o ed., Interamericana, Mc Graw-Hill, Madrid, España, p. 843-848.
9. BROCK, T.D.; SMITH, D.W.; MADIGAN, M.T., 1987. Microbiologia, Prentice-Hall Hispanoamericana. p. 814-817.
10. BRUGHMAN, B.; ENGBERG, B.; EHRENSPERGER, F., 1977. Demonstration of *Mycoplasma suis pneumoniae* in pig lungs on the enzyme-linked immunoperoxidasetechnique. Vet. Rec. 101 p. 137
11. CARTER, G. R.; COLE, JOHN R. Jr., 1990. Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology, 5^o ed., Lea & Febiger, Philadelphia. London, p. 343-351.
12. CARTER, G. R.; CHENGAPPA, M. M., 1991 Essential of veterinary bacteriology and mycology, 4^o ed., Lea & Febiger, Philadelphia. London, p. 237-239.

13. CATTY, D., 1990. Antibodies, a practical approach, Irl press, Oxford, England, p. 155-177.
14. CLARK, L.K.; SCHEIDT, A.B.; ARMSTRONG, C.H.; KNOX, K.; MAYROSE, V.B., 1991. The effect of all-in/all-out management on pigs from a herd with enzootic pneumonia. Veterinary medicine, p. 946-951.
15. CHIMAL P., La salud respiratoria de los cerdos jóvenes es crítica; Acontecer porcino, p. 47-50.
16. CIPRIAN C. J. A., 1978. Aislamiento y caracterización de micoplasma a partir de pulmones neumónicos de ovinos y caprinos en México, Tesis Maestría, FESC-UNAM, p. 81-91.
17. CIPRIAN C. J. A., 1987. Interacción entre *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Pasteurella multocida* en las neumonías de los cerdos, Tesis Doctorado, FESC-UNAM. p. 90-94.
18. CRUZ, S. T. A., 1983. Identificación de *Mycoplasma hyopneumoniae* a partir de pulmones neumónicos de cerdo en México, Tesis Licenciatura MVZ, FESC-UNAM, p. 35-37.
19. CRUZ, S. T. A.; AGUILERA C.E.; GUTIÉRREZ B. B. R.; HERNÁNDEZ G.F.V.G.; MENDOZA E. S.; HERNÁNDEZ B. E.; CIPRIAN C. A., 1995. Diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae* por el método de inmunoperoxidasa directa, Memorias de IX Foro Interno de Investigación, Investigación Multidisciplinaria FESC 1995, p. 290-292.
20. DAVIES, E.T., Manual de investigación veterinaria, Interamericana, Zaragoza, España, vol. 1, p. 43-170.
21. DONE, S.H., 1991. Environmental factors affecting the severity of pneumonia in pigs. The veterinary record, 128. p. 582-586.
22. DOSTER, A.R.; CHANG L.B., 1988. Identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* in formalin-fixed porcine lung, using an indirect immunoperoxidase method. Am. J. Vet. Res., vol. 49 no. 10. p. 1719-1721.
23. ESTRADA, R. R., 1994. Control de la neumonía enzoótica y su impacto económico. Nuestro Acontecer Porcino, Vol. II No. 10. p. 31-39.
24. ESTRADA, R. R., Presión de infección y enfermedades respiratorias del cerdo. Cerdos-Swine, Año I. No 1. p. 16-18.
25. FEENSTRA, A.A.; SORENSEN, V.; FRIIS, N.F.; JENSEN, N.E.; BILLE-HANSEN, V., 1994 Experimental *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs.

- Clinical signs, lesion and microbiology. Proceedings of the 13th IPVS Congress, Bangkok, Thailandia. p. 187.
26. FRIIS, N.F.; SZANCER, J., 1994. Sensitivity of certain porcine and bovine mycoplasmas to antimicrobial agents in a liquid medium test compared to a disc assay. Acta vet Scand., vol. 35, p. 389-394.
 27. GARCÍA, R. O.; LOBO M. G., 1989. Enfermedades de los cerdos, Trillas, México p. 100-105.
 28. GYLES, C.L.; THOEN, C.O., 1993. Pathogenesis of bacterial infections in animals, 2^{ed.}, Iowa State University Press/AMES, p. 297-310.
 29. HAGAN and BRUNERS W. A., 1992. Microbiology and infectious diseases of domestic animals, Library of Congress Cataloging Publicacion Data, U.S.A., p. 309-310.
 30. HALLIWEL, R.E.W.; GORMAN, N.T., 1992. Inmunología clínica veterinaria, 1^a ed., Acribia, Zaragoza España., p. 173-184.
 31. HANNAN, P.C.T.; HANLON, P.J.O.; ROGERS, N.H., 1989. In vitro evaluation of various quinolone antibacterial agents against veterinary mycoplasmas and porcine respiratory bacterial pathogens. Research in veterinary science, vol. 46, p. 202-211.
 32. HENSYL, W.R., 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology, 9^a ed., Baltimore Maryland, USA. p. 705-707.
 33. JAWETZ, MELNICK y ADELBERG G., 1996. Microbiología médica, 15^a ed., Manual Moderno, México D.F., p. 3-44.
 34. JIA-RONG, ch.; JYHS-HIUM, L.; CHUNG-NAN, W.; SHIOW-SUEY, L., 1998. Identification of a novel adhesin-like glycoprotein from *Mycoplasma hyopneumoniae*. Veterinary microbiology, p. 97-110.
 35. KOBISCH, M., 1987. Les mycoplasmoses respiratoires du porc. Rec. Med. Vét., 163 (4), p. 419-430.
 36. KOHN, D.F., CHINOOKOSWONG, N., 1989. Detection of *Mycoplasma pulmonis* in arthritic joints of rats by indirect immunoperoxidase staining. Infection and immunity, vol. 57, no 4, p. 1321-1323.
 37. KRUPP, M.A. 1993. Diagnóstico clínico y tratamiento. ed., Manual Moderno, México DF. p.12

38. LEMAN, A.D., 1986. Diseases of suine, Library of Congress Cataloging in Publication Data, Ames, Iowa, U.S.A., p. 469-475.
39. LE POTIER, M.F., ABIVEN, P., KOBISCH, M., 1994. A blocking ELISA using a monoclonal antibody for the serological detection of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Research in Veterinary Science, 56, p. 338-345.
40. LIUM, B.; LUND A.; SKOMSOY, A., A field study on vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. p. 191.
41. LLOYD, L.C., BADMAN, R.T., ETHERIDGE, J.R., McKECHNIE, K., IYER, H., 1984. Assessment of a complement fixation test to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. Australian Veterinary Journal, vol. 61, no. 7, p. 216-218.
42. MANILOFF, J., McELHANEY, R., FINCH, L.R., BASEMAN, J.B., 1992. Mycoplasmas, molecular biology and pathogenesis, Library of Congress Cataloging in Publication Data, Washington, D.C., U.S.A., p. 391-416.
43. MAQUEDA, A.J.J., Las neumonías cuestan mucho. Nuestro acontecer porcino, p. 16-25.
44. MASSEYEFF, R.F., ALBERT, W.H., STAINES, N.A., 1993. Methods of immunological analysis, vol. 3, Rep. Fed. Of Germany, p. 204-405.
45. MATSUOKA, T., KURIHARA, T., KONOSU, Y., IJIMA, Y., NARITA, M., HARITANI, M., 1987. Demonstration of Aujeszky's disease virus antigen in naturally infected cattle by immunoperoxidase method. Jpn. J.Vet. Sci., 49(3), p. 725-727.
46. MERINO, N., 1988. Desarrollo y perspectivas de las técnicas de inmunodiagnóstico en la patología veterinaria. Rvta. Cub. Cienc. Vet., vol. 19, no. 4, p. 335-340.
47. MONTARAZ, C.J.A., 1992. Inmunidad en el tracto respiratorio del cerdo. Avances Prod. Porcina., vol. 1, p. 100-102.
48. MORILLA, G.A., 1986. Manual de inmunología, 1ª ed., Diana, México, D.F., p. 97-145.
49. MORILLA, G.A., 1989. Inmunología veterinaria, 1ª ed., Diana, México, D.F., p. 181-187.
50. MORILLA, G.A., 1997. Manual para el control de las enfermedades infecciosas de los cerdos, p. 58-63.
51. NICOLET, J., 1986. Compendio de bacteriología médica veterinaria, Acribia, Zaragoza, España., p. 225-233.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

52. OUTERIDGE, P.M. 1989. Inmunología veterinaria, Acribia, Zaragoza, España., p. 104-107.
53. PASTORET, P.P.; GOVAERTS, A.; BAZIN, H., 1990. Immunologie animale, 3ª ed., Flamarión medicine-sciences, p. 229-234.
54. PIJOAN, P.; TORTORA, J.L., 1986. Principales enfermedades de los ovinos y caprinos. Pijoán P. y Tórtora J.L., p. 3-8.
55. PONCE, H. C., 1986. Cultivo, aislamiento y caracterización de *Mycoplasma hyopneumoniae* de Pulmones de Cerdo. Tesis Licenciatura QFB; FESC-UNAM, p. 22-24.
56. QUIN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R., 1994. Clinical veterinary microbiology, Virginia, USA., p. 320-326.
57. RAMÍREZ, R. N. PIJOAN A. C., 1987. Enfermedades de los cerdos, Diana, México, p. 290-295.
58. ROBINSON, W.F.; HUXTABLE, R.R., Clinicopathologic principles for veterinary medicine. Cambridge University press, p. 99-120.
59. ROSENBERGER, E.; COHEN, I.R., 1983. Microbial biology, Saunders college publishing, p. 116.
60. ROSS, R.F.; YOUNG, T., 1993. The nature and detection of mycoplasmal immunogens. Veterinary microbiology, vol. 37, p. 369-380.
61. SAHU, A.K.; BHOWMIK M.K., 1991. Isolation of mycoplasmas and the pathology of enzootic pneumonia in pigs. Indian Journal of Animal Sciences, vol. 61. no. 9, p. 920-933.
62. SÁNCHEZ-VIZCAÍNO; ALVARES, M.J.M., 1987. Manual de laboratorio de inmunología, Instituto nacional de investigaciones agrarias de sanidad animal.
63. SCANLAN, CH.M., 1991. Introducción a la bacteriología veterinaria, Acribia, Zaragoza España, p. 199.
64. SHELDRAKE, R.F.; GARDNER, I.A.; SAUNDERS, M.M.; ROMALIS, L.F., 1990. Serum antibody response to *Mycoplasma hyopneumoniae* measured by enzyme-linked immunosorbent assay after experimental and natural infection of pigs. Australian Veterinary Journal, vol. 67. no. 2, p. 39-42.
65. SISSON, S.; GROSSMAN, J.D., 1982. Anatomía de los animales domésticos, 5ª ed., Salvat, Tomo II, p. 1414-1429.

66. SOLANO, G.I., Diagnóstico oportuno en enfermedades respiratorias; Acontecer Porcino, p. 40-42.
67. SOLVAY DUPHAR VETERINARY: suvaxyn M.hyo. SUVAXYN ® M.hyo. Healtier pigs.
68. SORENSEN, V.; BARFORD, K.; AHRESNS, P.; FRIIS, N.; y cols., 1994. Comparison of four different methods for demonstration of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lungs of experimental inoculated pigs. Proceedings of the 13th International Pigs Veterinary Society, congress june, Bangkok, Tailandia. p. 188.
69. SORENSEN, V.; BARFORD, K.; FEENSTRA, A. A.; FELD, N.C., 1994. The humoral immune response to experimental *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs in relation to clinical signs and pathological lesions; Proceedings of the 13th International Pigs Veterinary Society, congress june, Bangkok, Tailandia. p. 190.
70. STANIER, R.Y.; ADELBERG, E.A.; INGRAHAM, J-L., 1985. Microbiología, 4^{ed.}, Reverté, Barcelona, España, p. 212-123.
71. STAFF MIDIA.; Actualidades sobre las enfermedades respiratorias del cerdo., Cerdos-Swine, Año 2 no. 14, p. 14-20.
72. STEPHANO, H. A., Situación de los problemas respiratorios en México. Tecnología Avípecuaria, Año 5 no. 58, p. 27-28.
73. TAYLOR, D.J., 1989. Pig diseases, Burlington Press (Cambridge), Gran Bretaña, p. 118-125.
74. TERYINC, T.; AVRAMEAS, 1989. Técnicas enzimo-histoquímicas en técnicas inmunoenzimáticas, Iberoamericana, p. 1-64.
75. THACKER, B., 2000. Estrategias para controlar al *Mycoplasma hyopneumoniae*, Cerdos-Swine, Año 3 no. 28, p. 21-24.
76. THRUSFIELD, M., 1990. Epidemiología veterinaria., Acribia, Zaragoza, España., 127-131.
77. TIZARD, I.R., 1998. Inmunología veterinaria, 5^a ed., Interamericana, México, D.F., p 119-203.
78. TRIGO, T.F.J., 1998. Patología sistémica veterinaria, 3^a ed., Mc Graw Hill- Interamericana, México, D.F., p 74-75.

79. VALLADARES, C.J.C., 1986. Establecimiento de la técnica de inmunoperoxidasa para el estudio de la distribución pulmonar de esporas de *Aspergillus fumigatus*. Tesis Licenciatura MVZ; FESC-UNAM, p. 20-22.
80. VEGA, L.M.A., 1994. Sistema inmune del tracto respiratorio. En: Resúmenes del simposio de inmunología del aparato respiratorio. Aguilera F.J.L., Ciprián C.A., Mendoza E. S.E., Romero R.A., p. 85-91.
81. WHITFORD, H.W.; ROSENBUSCH, R.F.; LAWERMAN, L.H., 1994. Mycoplasmosis in Animals: Laboratory Diagnosis, 1^a Ed. Iowa State University Press/AMES.
82. ZHANG, Q.; YOUNG, T.F.; ROSS, R.F., 1995. Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. Infection and immunity, vol. 63, no. 3, p. 1013-1019.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN