



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

"DESARROLLO DE UN MODELO EXPERIMENTAL PARA
DEMOSTRAR LA INTERACCION EXISTENTE ENTRE *Haemophilus*
parasuis y/o *Mycoplasma hyopneumoniae* y/o *Mycoplasma*
hyorhinis"

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN MICROBIOLOGIA

P R E S E N T A :

JESUS HORACIO LARA PUENTE

DIRECTORES MVZ, MC, DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO.

QFB, MC, DR. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA

ASESORES:

DMV, MC, DR. JORGE TORTORA PEREZ

MVZ, MC, DR. TONATIUH CRUZ SANCHEZ



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Jesus Horacio

Lara Puente

FECHA: 27-05-05

FIRMA: Jesus Horacio Lara Puente

Director de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM

Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo

SINODALES

Dr. Alfredo Sagahun Ruiz

Dra. Rosa Elena Miranda Morales

Dr. Pedro Pradal Roa

Dra. Ma. Elena Trujillo Ortega

Dr. Abel Ciprián Carrasco

**Triste es no tener amigos,
pero más triste debe de ser no tener enemigos,
porque el que enemigos no tenga, señal es que no
tiene:**

**Ni talento que haga sombra,
ni carácter que impresione,
ni valor temido,
ni honra de la que murmuren,
ni bienes que se le codicien,
ni cosas que se le inventen.**

José Martí

Los planes de Dios

Nos gusta vivir con libertad, escoger nuestros pasatiempos, ir con quienes amamos y disfrutar del sol en el verano y de la nieve en el invierno.

Nos cuesta someternos a otros, o descubrir que la vida, con sus sorpresas, rompe nuestros planes.

Un accidente, la enfermedad de un familiar, un despido en el trabajo, nos impiden el vuelo y, tal vez, nos dejan una sensación de frustración, de fracaso, al no poder realizar nuestros sueños.

Las sorpresas de la vida son muchas. A veces parece que hay más sorpresas que "normalidades". Otras veces, las cosas siguen su curso de siempre. Nos hacemos la ilusión de que todo está bajo control y, de repente, lo inesperado salta, y quedamos llenos de angustia, tal vez paralizados, sin saber qué hacer.

Si miramos a fondo, detrás de los imprevistos se escribe una historia que no siempre comprendemos.

Un despido puede convertirse en la ocasión para encontrar un trabajo mejor.

Una calumnia nos hace recordar que tal vez nosotros hemos dañado a otros con nuestras palabras. Una reprensión abre los ojos a nuestros defectos y nos permite valorar las cosas con menos egoísmo y con más sencillez.

No siempre es fácil descubrir lo bueno que se esconde en las aventuras de la vida. Lo negro destaca sobre el folio, pero lo blanco domina en muchas superficies.

El mal hace noticia, pero el bien escribe la historia. El dolor nos angustia y nos desconcierta, pero muchos pueden descubrir a Dios en la cama de un hospital.

La traición nos llena de amargura, pero por encima de ella hay quien nos ama y confía en nosotros, a pesar de todo.

Es difícil ponerse en manos de Dios si queremos llevar la vida según nuestros proyectos, como si todo dependiese de nosotros. Es muy fácil, en cambio, confiar en Él si descubrimos que nos ama.

Dios tiene planes que nosotros no podemos comprender. Algún día, cuando se deshaga nuestra tienda mortal, comprenderemos.

Ahora caminamos con la lámpara de la fe. Con ella se iluminan las tinieblas y se suavizan los dolores. Y cada amanecer nos recuerda el cariño de un Dios que viste a las flores silvestres y hace cantar a los jilgueros.

Confía en Dios él está junto a ti.....

Laura Cienfuegos /Fernando Pascual

A Dora Alicia, no-solo por ser mi compañera en las buenas, si no por que ha sido mi amiga en las malas.

Para mi hija María Citali, la luz de mi vida y la razón de mi ser. Con todo el amor que un padre puede dar.

A mis padres; Jesús y Teodomira, por que han sido y serán, un ejemplo de respeto y amor a seguir.

A mi "hermanita" Argelia, por que sabe lo que representa para mí.

A María de la Luz, Oralia, y Gabriela, por ser parte importante en mis sentimientos.

A Evaristo, por que la iluminación nos llegue a tiempo.

A mi "niña" Goldie, por que desde donde se encuentre, me sigue cuidando.

Alejandra, mas vale tarde que nunca.

Gilberto, por tu amistad.

Al Dr. Abel Ciprián Carrasco, por ser mi maestro, mentor y mi amigo.

A la Dra. Susana Mendoza Elvira, por no dejarme caer en la mediocridad y orientarme en el camino.

A Manuel, Angélica, Daniel y Lilia, por su entendimiento y amistad.

A Ericka por ser una inmejorable compañera de tesis y aventuras.

A mis demás compañeros de postgrado.

A todos los *Sus scrofa domesticus* por que sin ellos, nada de esto se hubiera podido realizar. Su sacrificio no fue en vano.

AGRADECIMIENTOS

Doy las gracias a:

Dr. Eliseo Hernández Baumgarten
Dr. Pablo Correa G.
MC, Antonia Coba
Ing. Fernando Sotres Carrera
MVZ, Esp. Alberto Orduña Sumaran
Gabino Sánchez Galindo
David Trujillo Ceballos

Por su apoyo incondicional y buenos consejos, los que contribuyeron a que esta meta se alcanzara.

RESUMEN

Los problemas neumónicos hoy en día son la causa más importante de pérdidas económicas para el productor porcino, ya sea como decomiso en rastro o por una deficiente conversión alimenticia (Fernández y Lara 1994).

Existen evidencias de una marcada interacción entre los agentes virales y bacterianos en la presentación de neumonías en los animales domésticos (Falcón 1989). Este efecto sinérgico, lo demostró Matthews y Pattison (1961) entre el virus de la FPC y *Haemophilus parainfluenzae* ó Pijoan y Ochoa (1978) con virus vacunal de FPC y *P. multocida*. También se ha comprobado este tipo de fenómeno entre *Mycoplasma hyopneumoniae* y *P. multocida* (Ciprián y cols 1988) y el de *M. hyopneumoniae* y *A. pleuropneumoniae* (Yagihashi y cols. 1984).

Desde 1994 en México se han presentado una serie de problemas de tipo neumónico, en donde según algunos investigadores se puede encontrar relacionado al *H. parasuis* con Micoplasmas. En 1994 el *H. parasuis* fue aislado de varios casos de campo por Trujano e Iglesias, indicando que debido a la falta de familiaridad con este agente, no se le este dando la importancia que posiblemente puede tener en nuestro país.

Debido a lo anterior surge la idea para la realización de la presente investigación, donde se utilizaron 32 lechones de 21 días de edad procedentes de una granja seronegativa a PRRSv, VEA, FPC, Enfermedad del Ojo Azul, *A. pleuropneumoniae*, *M. hyopneumoniae* y *H. parasuis*. Los cuales se dividieron en 8 grupos y se les desafío de la siguiente manera: Grupo 1, 4, 5 y 6, desafiado intratraquealmente (IT) el día 1 con *M. hyopneumoniae*; el día 11 se desafiaron por vía IT, con *M. hyorhinis* los grupos 2, 4, 5 y 7; el día 16 se desafiaron por nebulización, con *H. parasuis* los grupos 3, 5, 6 y 7. Siguiendo el mismo calendario, se desafío el grupo 8 (control negativo) con solución salina fisiológica estéril por vía IT. Se utilizó la cepa ATCC 19417 de *H. parasuis*, la ATCC 25934 de *M. hyopneumoniae* y la ATCC 17981 de *M. hyorhinis*.

Se evaluaron manifestaciones clínicas, temperatura rectal y lesiones pulmonares a la necropsia, se realizaron reaistamientos y evaluaciones serológicas.

Los signos clínicos fueron desde estomudos, tos seca, estertores húmedo, postración, disnea y respiración abdominal, las lesiones pulmonares fueron de un 2, 3, 13, 3, 10, 3, 29 y 0 % respectivamente para cada grupo desafiado, las lesiones pulmonares fueron de tipo consolidación roja craneoventral con resoluciones y adherencias pulmonares, así como hidrotórax y aumento del volumen del líquido sinovial. Microscópicamente encontramos en el grupo 1, trombos, BALT activado, neumonía intersticial; grupo 2, hiperemia, hemorragia, macrófagos activados, BALT activado; grupo 3, BALT activado, periarteritis, bronquiolo c/ detritus celular, macrófagos activados y en destrucción, zonas de fibrosis, fibrina, polimorfonucleares en bronquiolo; grupo 4, septo interlobular

engrosado, BALT activado, neumonía intersticial; grupo 5, BALT activado, macrófagos activados y en destrucción; grupo 6, hepatitis con necrosis focal con acumulo de mononucleares; grupo 7, BALT activado, neumonía intersticial, severas adherencias en hígado y el grupo 8, SCPA. Las pruebas serológicas correspondieron a cada agente involucrado en los grupos. Aunque se evidenciaron manifestaciones clínicas, lesiones macroscópicas y microscópicas, no hubo diferencias estadísticamente significativas evaluadas en un diseño completamente aleatorio.

Es necesario realizar mas investigaciones tomando en cuenta todos los parámetros clínicos para evaluar la interacción de estos agentes, tanto de manera experimental como en campo.

LISTA DE CUADROS

CUADRO	PAGINA
Cuadro 1. Cantidad de muestras biológicas colectadas de diferentes granjas.	52
Cuadro 2. Diseño experimental efectuado con ocho grupos de cuatro cerdos cada uno.	54
Cuadro 3. Aislamientos de <i>Haemophilus parasuis</i> , encontrado en los tejidos y líquidos corporales de los cerdos con signos clínicos respiratorios y/o nerviosos.	59
Cuadro 4. Identificación con pruebas bioquímicas de las cepas de <i>Haemophilus parasuis</i> aisladas de cerdos enfermos.	59
Cuadro 5. Resultado de los diagnósticos serológicos encontrados en los animales de experimentación.	61
Cuadro 6. Temperaturas registradas por promedio durante los 23 días del experimento.	62
Cuadro 7. Resumen de los signos clínicos.	68
Cuadro 8. Resumen de las lesiones macroscópicas encontradas en todos los grupos experimentales.	69
Cuadro 9. Descripción de las lesiones microscópicas encontradas en los pulmones de los cerdos desafiados (histopatología).	80
Cuadro 10. Resumen de los hallazgos de histopatología encontrados en los pulmones de los animales inoculados.	83
Cuadro 11. Resultado de los estudios serológicos de los sueros de los animales antes y después del desafío.	83
Cuadro 12. Recuperación de los agentes inoculados en los cerdos de los diversos grupos experimentales.	84

LISTA DE GRÁFICAS

GRAFICA	PAGINA
Gráfica 1. Registro del promedio de temperaturas del Grupo 1.	63
Gráfica 2. Registro del promedio de temperaturas del Grupo 2.	63
Gráfica 3. Registro del promedio de temperaturas del Grupo 3.	64
Gráfica 4. Registro del promedio de temperaturas del Grupo 4.	64
Gráfica 5. Registro del promedio de temperaturas del Grupo 5.	65
Gráfica 6. Registro del promedio de temperaturas del Grupo 6.	65
Gráfica 7. Registro del promedio de temperaturas del Grupo 7.	66
Gráfica 8. Registro del promedio de temperaturas del Grupo 8.	66
Gráfica 9. Porcentaje del promedio de las lesiones pulmonares de todos los grupos experimentales.	79
Gráfica 10. Peso promedio en los diversos grupos experimentales.	84
Gráfica 11. Ganancia de peso promedio por semana.	85

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PAGINA
Figura 1. GRUPO 1. <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .	71
Figura 2. Grupo 2. <i>Mycoplasma hyorhinis</i> .	72
Figura 3. Grupo 3. <i>Haemophilus parasuis</i> .	73
Figura 4. Grupo 4. <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> – <i>Mycoplasma hyorhinis</i>	74
Figura 5. Grupo 5. <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> – <i>Mycoplasma hyorhinis</i> – <i>Haemophilus parasuis</i> .	75
Figura 6. Grupo 6. <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> - <i>Haemophilus parasuis</i> .	76
Figura 7. Grupo 7. <i>Mycoplasma hyorhinis</i> – <i>Haemophilus parasuis</i> .	77
Figura 8. Grupo 8. Control.	78

INDICE

Agradecimientos	a
Resumen	b
Lista de cuadros	d
Lista de gráficas	e
Lista de figuras	f
1.- Introducción.....	1
1.1 Estructura y funcionamiento del sistema respiratorio.....	1
1.1.1 Estructura.....	1
1.1.1.1 Sistema tubular.....	1
1.2 Función.....	2
1.2.3 Desordenes respiratorios.....	5
1.2.3.1.1. Rinitis.....	5
1.2.3.1.2 Neumonías.....	5
1.2.3.1.3 Distribución de lesiones pulmonares.....	7
1.2.3.1.4 Factores causales de enfermedad respiratoria.....	8
1.2.3.1.4.1 Consideraciones epidemiológicas.....	8
1.2.3.1.4.2 Infección respiratoria en individuos y en piaras.....	9
1.2.3.1.5 <i>Haemophilus parasuis</i> y <i>Mycoplasma hyorhinis</i>	9
1.2.3.2 Interacciones entre agentes infecciosos.....	11
1.3 Género: <i>Haemophilus</i>	13
1.3.1 Especies: <i>parasuis</i>	13
1.3.1.1 Antecedentes.....	13
1.3.1.2 Definición de la enfermedad.....	13
1.3.1.3 Agente etiológico.....	13
1.3.1.3.1 Distribución en la naturaleza.....	14
1.3.1.3.2 Características morfológicas y tintoriales.....	14
1.3.1.3.3 Características de cultivo.....	15
1.3.1.4 Resistencia a los agentes químicos y físicos.....	16

1.3.1.5 Mecanismos de virulencia.....	16
1.3.1.5.1 Antígenos.....	17
1.3.1.5.1.1 Cápsula.....	17
1.3.1.5.1.2 Liposacáridos.....	17
1.3.1.5.1.3 Proteínas de membrana externas.....	18
1.3.1.5.1.4 Pared celular.....	19
1.3.1.5.1.5 Antígenos termoestables.....	19
1.3.1.5.1.6 Toxinas.....	21
1.3.1.6 Interacciones patógenas.....	21
1.3.1.7 Inmunidad y biológicos vacunales.....	23
1.3.1.8. Diagnóstico microbiológico y epidemiología.....	24
1.3.1.9 Prevalencia de los serotipos.....	25
1.3.1.10 Métodos diagnósticos.....	27
1.3.1.10.1 Pruebas inmunes.....	27
1.3.1.11 Resistencia y sensibilidad antimicrobiana.....	27
1.4 Neumonía enzoótica de los cerdos.....	29
1.4.1 Introducción.....	29
1.4.1.1 Papel de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	29
1.4.2 Etiología.....	30
1.4.2.1 Características generales de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	31
1.4.2.2. Antígenos de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	32
1.4.2.3 Características Generales de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	33
1.4.2.3.1 Patogenia de la "Neumonía Enzoótica".....	34
1.4.2.4 Inmunidad.....	38
1.4.2.5 Diagnóstico de la Neumonía Enzoótica.....	40
1.4.2.6 Historia y signos clínicos.....	40
1.4.2.7 Lesiones macro y microscópicas.....	40
1.4.2.8 Aislamiento e Identificación de Micoplasmas.....	41
1.4.2.8.1 Pruebas bioquímicas en la caracterización de micoplasmas.....	41
1.4.2.8.1.1 Prueba de dependencia de esteroides.....	41
1.4.2.8.1.2 La prueba de fermentación de los carbohidratos.....	42

1.4.2.8.1.3 Prueba de reducción del tetrazolio.....	42
1.4.2.8.1.4 Prueba de hidrólisis de la arginina.....	42
1.4.2.8.1.5 Prueba de hidrólisis de la urea.....	42
1.4.2.8.1.6 Prueba de producción de peróxido de hidrógeno.....	42
1.4.2.8.1.7 Pruebas serológicas en la identificación de los micoplasmas.....	42
1.4.2.8.2 Detección de <i>M. hyopneumoniae</i> , en tejido pulmonar.....	43
1.4.2.8.3 Inmunodiagnóstico.....	43
1.4.2.9 Control de la Neumonía Enzoótica mediante la vacunación.....	44
1.4.2.9.1 Inmunógenos convencionales.....	44
1.4.2.9.2 Inmunógenos de extractos de membrana.....	47
1.4.2.9.3 Inmunógenos de subunidades.....	47
1.5 <i>Mycoplasma hyorhinis</i>	47
1.5.1 Epidemiología.....	47
1.5.2 Patogénesis.....	48
1.5.3 Signos clínicos.....	48
1.5.4 Lesiones.....	48
1.5.5 Diagnóstico.....	49
1.5.6 Tratamiento.....	49
1.5.7 Prevención.....	50
2.- Objetivos.....	51
2.1 Objetivo general.....	51
2.2 Objetivos Particulares.....	51
3.- Material y Métodos.....	52
3.1 Colección de muestras de diferentes granjas.....	52
3.2 Aislamiento e identificación de <i>Haemophilus parasuis</i>	52
3.3 Preparación de los inóculos con las cepas de trabajo.....	52
3.4 Diseño Experimental.....	53
3.4.1 Instalaciones.....	53
3.4.2 Animales.....	53
3.5 Cámara de Nebulización.....	53
3.6 Toma de muestras y constantes fisiológicas.....	54

3.7 Necropsia y evaluación de las lesiones macroscópicas.....	54
3.8 Reaislamiento de los agentes inoculados.....	54
3.9 Histopatología.....	55
3.10 Serología.....	55
3.11 Parámetros productivos de ganancia de peso.....	55
3.12 Medios de cultivo para micoplasma.....	55
3.12.1 Medios líquidos para aislamiento.....	55
3.12.1.1 Extracto de levadura (Carter 1975; Boughton y Thoms 1976).....	55
3.12.2 Medio HP " <i>hyopneumoniae</i> " modificado por Friis.....	56
3.12.2.1 Solución salina balanceada modificada por Hanks:.....	56
3.12.3 Medios Sólidos.....	57
3.12.3.1 Medio de Friis.....	57
3.12.4 Medios Líquidos para Caracterización Bioquímica.....	57
3.12.4.1 Medio de Arginina (hidrólisis):.....	57
3.12.4.2 Medio de Glucosa (fermentación):.....	57
3.13 Soluciones.....	58
3.13.1 Solución para la prueba de dependencia de esterotes.....	58
3.13.2 Solución de azul de metileno para la prueba de producción de peróxido de hidrógeno.....	58
3.13.3 Solución modificada de Alsever.....	58
3.14 Antisuero de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	58
4. Resultados	59
4.1. Aislamientos de campo de <i>Haemophilus parasuis</i>	59
4.2. Preparación de los inóculos.....	60
4.2.1. <i>Haemophilus parasuis</i>	60
4.2.2. <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	60
4.2.3. <i>Mycoplasma hyorhinis</i>	60
4.3. Status sanitario de los cerdos en experimentación.....	60
4.4. Aerosolización con los diversos inóculos.....	61
4.4.1. Signología.....	61
4.4.1.1. Temperaturas.....	61

4.4.1.2. Signos clínicos.....	67
4.5. Lesiones encontradas a la necropsia.....	68
4.5.1. Análisis estadísticos.....	69
4.5.2. Análisis estadístico por grupos.....	79
4.6. Lesiones microscópicas.....	80
4.7. Estudios serológicos.....	83
4.8. Reaislamiento de los agentes inoculados.....	84
4.9. Determinación de los parámetros productivos.....	84
5. Discusión.....	86
6. Bibliografía.....	92

1.- INTRODUCCIÓN.

La estructura de producción del cerdo en los países industrializados ha cambiado substancialmente en años recientes, grandes grupos de animales se alojan bajo condiciones intensivas y a menudo en regiones con poblaciones porcinas sumamente densas. La producción de cerdos en áreas con una alta densidad por metro cuadrado facilita la transmisión de patógenos principalmente por vía aérea (Donham, 1991) y también entre las diferentes piaras (Flori y col. 1995; Jorsal y Thomsen 1988). Por consiguiente los desordenes respiratorios y las enfermedades sistémicas aerotransportadas son consideradas hoy como el problema de enfermedad más serio en la producción moderna del cerdo.

1.1 Estructura y funcionamiento del sistema respiratorio

1.1.1 Estructura.

El tracto respiratorio se forma de la parte anterior de la ampolla germinativa como un órgano de tres estructuras tubular.

El aparato respiratorio maduro ésta formado por la cavidad nasal, faringe, laringe, traquea, y pulmones los cuales contienen a los bronquios, bronquiolos y alvéolos. Los pulmones están embebidos en el saco pleural en la cavidad torácica.

Existen dos sistemas sanguíneos diferentes en los pulmones. El sistema de la arteria pulmonar, la cual vasculariza el plexo capilar que rodea a los alvéolos con sangre venosa, proveniente del ventrículo derecho del corazón. El paralelismo funcional y estructural tan cercano que existe entre éste flujo sanguíneo y el sistema de entrada de aire es importante de tomar en cuenta cuando se quieran interpretar las posibles rutas de infección a los pulmones.

Las estructuras de soporte alrededor de la traquea, bronquios, bronquiolos y aún la pared de la arteria pulmonar son irrigadas con sangre del árbol de la arteria bronquial. (Straw B. 1999)

1.1.1.1 Sistema tubular

1.1.1.1.1 Cavidad nasal. La cavidad nasal en la raza Landrace y en los cerdos salvajes es larga y estrecha. La nariz en otras razas puede ser más corta. La cavidad nasal ésta dividida longitudinalmente por el septo nasal. Dos huesos turbinados dividen cada una de las dos mitades en tres diferentes compartimentos (dorsal, medio y ventral). La región vestibular de la cavidad nasal ésta compuesta por un epitelio estratificado escamoso. Posteriormente el epitelio cambia de columnar estratificado a ciliado pseudoestratificado con células de copa. El epitelio respiratorio está cubierto por una mucosidad producida por las células en copa.

- 1.1.1.1.2 Traquea, bronquios, bronquiolos y alvéolos. La traquea es corta y se divide posteriormente en dos bronquios principales, uno para el pulmón izquierdo y otro para el derecho. Una rama del bronquio traqueal entra al lóbulo apical del pulmón derecho. Otra rama del bronquio principal derecho entra al lóbulo cardiaco derecho y otra al lóbulo intermedio y continúa hasta ramificarse en el lóbulo diafragmático derecho. El bronquio principal izquierdo se divide, una de sus ramas va al lóbulo apical izquierdo y otra al lóbulo cardiaco. El bronquio principal se continúa posteriormente al lóbulo diafragmático izquierdo. Las ramas finas del sistema tubular que se continúan de los bronquios son los bronquiolos, los cuales se dividen a su vez en conductos alveolares y finalmente en alvéolos.
- 1.1.1.1.3 La laringe, traquea y bronquios están cubiertos por un epitelio como el de la faringe, es decir pseudoestratificado ciliado con células de copa. Conforme el bronquiolo se acerca a los alvéolos, el epitelio se reduce de tamaño hasta formarse un epitelio tipo escamoso.
- 1.1.1.1.4 Secciones del bronquiolo (llamados bronquiolos respiratorios) y las paredes de los alvéolos son cubiertas por un epitelio simple plano (células alveolares tipo I) y por un muy bajo porcentaje de epitelio cúbico simple (células alveolares tipo II). Las células alveolares tipo II, producen la sustancia surfactante y sirven como células progenitoras de las células alveolares tipo I. La pared alveolar está íntimamente relacionada con el plexo capilar de la circulación sanguínea pulmonar.
- 1.1.1.2 Apariencia macroscópica del pulmón. En el cerdo los pulmones están divididos en siete lóbulos: el pulmón derecho se divide en el lóbulo apical, cardiaco, diafragmático y lóbulo intermedio, el pulmón izquierdo incluye a los lóbulos apicales, cardiacos y diafragmáticos izquierdos. Los lóbulos están subdivididos por septos en lobulillos. Los procesos patológicos a menudo son retenidos por las estructuras lobulares, esto se puede observar en el caso de la bronconeumonía catarral en donde se denotan claramente los límites de los tejidos afectados de los normales.

1.2 Función.

El intercambio gaseoso que se lleva a cabo entre el aire inhalado y la sangre proveniente de la arteria pulmonar se realiza a nivel alveolar. Solamente una pequeña parte del volumen total de aire es renovado en cada respiración. En un cerdo descansando aproximadamente entre el 10 al 15 % del aire alveolar es intercambiado en cada respiración. La frecuencia respiratoria normal del cerdo varía dependiendo de su edad y de su peso así como en cierta medida del medio ambiente.

- 1.2.1 Mecanismos de defensa del sistema respiratorio. La superficie mucosa del tracto respiratorio provee una interfase crítica entre el cerdo y su medio ambiente. En el caso de la superficie epitelial respiratoria funciona como una membrana de difusión, por lo que la necesidad de estar bien equipada con un sistema de defensa especializado es más que obvia.

La cavidad nasal ésta diseñada para remover grandes partículas, las cuales son atrapadas por las vellosidades de las narinas y depositadas por gravedad en el moco. Otra función es la de humidificar y calentar el aire entrante antes de llegar a las vías respiratorias bajas, lo cual logra gracias a la vasta red de sinusoides sanguíneos que la recubren. La gran mayoría de las partículas inspiradas son atrapadas por el moco nasal, faríngeo, laríngeo y traqueal. Se sabe que solo partículas menores a 5 μm de diámetro son capaces de alcanzar y depositarse en la superficie alveolar. Las partículas con un diámetro mayor a 10 μm normalmente son depositadas en el moco antes de alcanzar los bronquios y bronquiolos (Baskerville 1981).

- 1.2.1.1 Defensa mucociliar. Las partículas atrapadas en el moco epitelial son expulsadas por la acción del mecanismo mucociliar. La alfombra de cilios en los bronquios y bronquiolos produce un flujo continuo de movimiento del moco hacia la faringe. El movimiento rítmico de los cilios produce una velocidad de movimiento de 4 a 15 mm por minuto (Done 1988). El moco de la cavidad nasal es llevado a la faringe y de ahí es deglutido y de ésta manera el moco con las partículas atrapadas en el (virus, bacterias, etc.) son atacados y en la mayoría de los casos inactivados.

- 1.2.1.2 Fagocitos. Los macrófagos alveolares neutralizan el material extraño que se escapa del mecanismo mucociliar de defensa. Las partículas no patógenas y los microorganismos son eliminados por fagocitosis y son removidos del flujo mucociliar por el sistema linfático

Los microorganismos patógenos son neutralizados con la ayuda de secreciones específicas como la lisozima, interferones, opsoninas, lactoferrinas, factores de complemento e inmunoglobulinas específicas presentes en el moco. Si los agentes invasores no son neutralizados por los macrófagos alveolares, el proceso de inflamación puede suceder. Los neutrófilos de la sangre migrarán a los alvéolos y ayudarán a los macrófagos en la actividad fagocítica. En cerdos sanos el rango normal entre los elementos celulares en el moco bronquioalveolar es entre 70 a 80 % de macrófagos alveolares, 11 a 18% de linfocitos, 8 a 12 % de neutrófilos y hasta un 5 % de eosinófilos (Neumann y col. 1985).

El sistema fagocítico celular también incluye a los macrófagos intravasculares, los cuales en el cerdo son particularmente numerosos (Bertram 1985; Ohgami y col. 1989) en el pulmón, así como a los histiocitos con propiedades fagocíticas en el tejido conectivo. La actividad

de los fagocitos se incrementa en los casos donde los patógenos introducidos no son eliminados rápidamente o en los casos cuando son reconocidos por haber tenido contacto anteriormente con ellos. En estos casos se activa la producción de inmunoglobulinas específicas producidas por linfocitos B derivados de células plasmáticas, todo bajo la dirección de los linfocitos T.

- 1.2.1.3 Inmunoglobulinas. La producción de inmunoglobulinas específicas es de vital importancia en la defensa inmune del aparato respiratorio. Su función biológica consiste en la neutralización de los antígenos por medio de la producción de complejos antígeno-anticuerpo no patógenos.

Las inmunoglobulinas predominantes en el moco son las del tipo IgA. Un componente secretor toma parte en la protección de la IgA y posiblemente de algunas IgM. Las IgM son globulinas altamente eficaces que se liberan principalmente en las respuestas inmunes tempranas, particularmente en los cerdos recién nacidos. Las globulinas IgG provenientes del suero sanguíneo forman la mayor parte de las inmunoglobulinas presentes en el moco del tracto respiratorio bajo cercano a los alvéolos. Las inmunoglobulinas que se encuentran en la superficie del moco primariamente actúan en la prevención del establecimiento y penetración de los patógenos.

- 1.2.1.4 Respuesta inmune celular. Generalmente la inmunidad mediada por células es identificada como el brazo efector de la respuesta inmune celular por medio de las células T citotóxicas, células naturalmente asesinas, macrófagos activados, y células citotóxicas dependientes de anticuerpos. La repuesta inmune mediada por células es de suma importancia en las infecciones virales como Influenza Porcina y la enfermedad de Aujeszky.

Rothschild y col. (1984) demostraron que el complejo SLA (proteínas de superficie antigénicas de los leucocitos porcinos) estaba asociado con la respuesta inmune contra *Bordetella bronchiseptica*, post vacunación.

El lechón recién nacido es capaz de absorber linfocitos intactos presentes en el calostro. Estas células pueden conferir una protección inmune celular de la cerda al lechón (Tuboly y col. 1988). El pasaje transepitelial del lumen del tracto respiratorio a la corriente sanguínea de macromoléculas antigénicamente intactas pueden realizarse durante los primeros días de edad del lechón y en cierto grado también en cerdos de edades mayores (Folkesson y col. 1990). Esto pudiera indicar la utilización futura de vacunas en aerosol.

En experimentos de vacunación, donde se han utilizado cerdos que presentan anticuerpos adquiridos pasivamente contra la enfermedad de Aujeszky, se ha observado que se puede obtener una respuesta inmune local sin que interfieran los anticuerpos adquiridos de la madre

(Schlesinger y col. 1990). Nielsen y col. (1990) obtuvieron una buena protección inmune contra *Actinobacillus pleuropneumoniae*, con la aplicación local de antígenos en el tracto respiratorio.

1.2.3 Desordenes respiratorios.

1.2.3.1 Patología. Bajo condiciones comerciales es muy probable que muy pocos cerdos alcancen el peso a mercado sin haber contraído algún tipo de lesión respiratoria. Las alteraciones patológicas pueden agruparse en tres grandes grupos:

- 1.- Rinitis.
- 2.- Neumonías .
- 3.- Pleuritis.

1.2.3.1.1. Rinitis.

La inflamación catarral de la mucosa nasal es común en animales jóvenes. La causa puede ser infecciosa (Virus de Aujeszky, cytomegalovirus, *Bordetella bronchiseptica*, *Mycoplasma hyorhinis*, etc.) pero también los niveles altos de amoníaco y el polvo en el medio ambiente pueden provocar una inflamación no severa de la mucosa de corta duración. Sin embargo si cepas toxigénicas de *Pasteurella multocida*, están presentes, aún las más ligeras alteraciones en la mucosa nasal pueden ser suficientes para que se adhieran y proliferen causando una rinitis atrófica progresiva con daño y alteraciones de la estructura y funcionamiento permanentes. Los cambios estructurales en la rinitis atrófica son principalmente inducidos por la alteración en el proceso metabólico del hueso sin causar inflamación de los tejidos (Foged y col. 1987).

1.2.3.1.2 Neumonías.

1.2.3.1.2.1 La bronconeumonía catarral que se localiza craneoventralmente es una lesión frecuente del pulmón en cerdos de todas las edades. Desde que *Mycoplasma hyopneumoniae*, se ha detectado en esas lesiones de manera frecuente se le ha denominado como neumonía tipo micoplásmica. Una neumonía causada por *Mycoplasma hyopneumoniae*, que no esté complicada, típicamente se ve como un área confluyente de tejido consolidado de color púrpura a gris, en donde el tejido se encuentra más colapsado que el pulmón normal. Las lesiones tempranas son algo diferentes pero después de 2 a 3 semanas las lesiones claramente están demarcadas del tejido adyacente por una ligera línea que sigue al septo interlobular. Cuando se realiza un corte en estas áreas, la consistencia es similar a la de la carne, pero no tan firme. Un exudado catarral se puede apreciar en los espacios aéreos del tejido afectado. Las infecciones

secundarias pueden alterar el color a uno grisáceo, y la consistencia puede ser más firme, debido a la formación de tejido fibroso en la zona. Más aún la bronconeumonía catarral complicada, puede asociarse con bronquitis purulenta y la formación de abscesos. En pulmones previamente afectados por una bronconeumonía catarral es común encontrar fisuras (Bertschinger y col. 1972).

- 1.2.3.1.2.2 La neumonía fibrinosa necrotizante es otra entidad patológica común del pulmón, la cual afecta comúnmente las porciones dorsocaudales del pulmón, en contraste con las craneoventrales encontradas en la bronconeumonía catarral. El tejido dañado frecuentemente se encuentra por encima del tejido normal adyacente y cruza los septos interlobulares, a diferencia de la neumonía catarral. La neumonía fibrinosa necrotizante también es llamada pleuroneumonía, debido a que la superficie pleural ésta afectada en casi todos los casos. En los casos agudos la pleura inflamada se cubre de un exudado fibrinoso. En los casos subagudos o crónicos la lesión pleural asociada consiste en tejido fibrinoso, lo que provoca una adherencia del pulmón a las paredes del tórax.
- 1.2.3.1.2.3 La neumonía intersticial es una condición en donde el proceso de inflamación involucra primariamente a las paredes alveolares y al tejido intersticial, en contraste con la bronconeumonía, donde la inflamación principalmente afecta a los bronquiolos y sus ramificaciones más finas (las uniones bronquialveolares). También en contraste con la bronconeumonía, la neumonía intersticial se distribuye ampliamente sobre todo el pulmón. Una neumonía intersticial típica es la que produce el virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS, por sus siglas en ingles).
- 1.2.3.1.2.4 La neumonía embólica o tromboembólica es causada por agentes que son diseminados por vía hemática, comúnmente bacterias piogénicas que se desarrollan primariamente en otras partes del cuerpo. Típicamente éste tipo de neumonía empieza como un foco necrótico pequeño rodeado por una zona hemorrágica. La supuración del centro es la subsiguiente parte de la misma y de ahí a la formación de un absceso circunscrito. Una bronconeumonía o una inflamación tipo pleuroneumonía puede formarse de manera secundaria alrededor del foco primario. Las migraciones de parásitos (principalmente vermes) a través del pulmón forman un foco hemorrágico pequeño, pequeños abscesos y granulomas firmes. Normalmente los procesos de migraciones larvarias o de parásitos se localizan dorsocaudalmente en el pulmón.
- 1.2.3.1.2.5 La cicatrización de las bronconeumonías catarrales es un proceso lento, que puede tomar varias semanas o meses en completarse. Sin embargo el periodo de cicatrización depende en gran medida de los agentes involucrados. En cerdos libres de patógenos específicos (SPF) inoculados con *Mycoplasma hyopneumoniae*, las lesiones causadas cicatrizaron 2

meses después, pero las áreas fisuradas del pulmón persistieron por más de 3 meses (Bertschinger y col. 1972; Kobisch y col. 1993). Si comparamos el tiempo de la seroconversión con las lesiones encontradas a rastro, Wallgren y col. (1994) estimaron que la duración de la neumonía micoplásmica aproximadamente de 12 semanas, Pattison en (1956) también halla lesiones neumónicas 175 días después de la inoculación con *Mycoplasma hyopneumoniae*, presumiblemente debido a una infección bacteriana secundaria.

La bronconeumonía catarral difiere en el intervalo de aparición y desaparición de las lesiones si la comparamos con la pleuroneumonía fibrinonecrotica que produce *Actinobacillus pleuropneumoniae*, la cual es sorprendentemente corta (alrededor de 3 semanas) siempre y cuando no existan infecciones secundarias (Straw y col. 1999).

- 1.2.3.1.2.6 Pleuritis: la adherencia fibrinosa entre las membranas pleurales y viscerales del saco pleural (pleuritis crónica, lesión pleural) es una de las alteraciones patológicas más frecuentes encontradas en el rastro de cerdos. La pleuritis fibrinosa, que afecta grandes áreas también se asocia frecuentemente con lesiones similares en el saco pericárdico (pericarditis crónica). La reparación de estas lesiones es un proceso largo, con una duración de entre 1 mes, hasta 2 ó 3 meses (Christensen 1981). Al tomar en cuenta estudios en rastro de hembras sacrificadas con un conocimiento histórico clínico de sus enfermedades, en donde se encontraron lesiones pleurales y particularmente pericárdicas se determinó que pueden persistir por más de un año (Straw y col. 1999). La resolución más pronta de las pleuritis crónicas puede ser una causa de que los cerdos de engorda más jóvenes tengan una frecuencia más alta de presentación que en cerdos más viejos (Mousing 1993).

1.2.3.1.3 Distribución de lesiones pulmonares

La distribución craneoventral de las lesiones tipo micoplasma y otras bronconeumonias, puede deberse a la poca efectividad de los mecanismos de defensa en ésta región. Esto se puede soportar por el hecho de que *Pasteurella haemolytica* causa una neumonía en ésta región aún si la bacteria alcanza el pulmón por vía sanguínea (Dungworth 1993). La influencia de la gravedad, así como el reflujo de las secreciones puede ser un factor a tomar en cuenta en ésta situación.

Experimentalmente la aerosolización de *Bacillus subtilis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Sebunya y col. 1983), y *Staphylococcus aureus* (Kastner y Mehlhorn 1989) hace que la suspensión de bacterias sea depositada primariamente en los lóbulos caudales. Esto es correspondiente al hecho de que *Actinobacillus pleuropneumoniae*, predominantemente produce una pleuroneumonía localizada dorsocaudalmente.

En otra investigación, la aerosolización de una suspensión marcada radiactivamente de *Pasteurella multocida*, demostró una distribución uniforme en todos los lóbulos pulmonares (Heilmann y col., 1988).

Usualmente las lesiones causadas por bacterias que son introducidas por vía hematogena tienen una distribución aleatoria, lo cual las hace fácilmente distinguibles de lesiones que son por diseminación broncogénica (Buttenschön 1989).

La pleuritis crónica ésta normalmente asociada a una inflamación actual o a una previa del tejido pulmonar, por la localización de las lesiones pleuríticas tiene un alto valor diagnóstico para determinar el tipo de neumonía involucrada.

1.2.3.1.4 Factores causales de enfermedad respiratoria.

1.2.3.1.4.1 Consideraciones epidemiológicas.

La enfermedad respiratoria debe de ser vista como el resultado de complejos y diversos eventos, incluyendo la infección, medio ambiente, manejo, y factores genéticos. Debido a que la etiología de la enfermedad respiratoria es multifactorial, uno debe de considerar no solo a un agente infeccioso específico, sino también a los factores relevantes existentes.

Al tener a un patógeno o un riesgo ambiental, la incidencia de la enfermedad se puede incrementar. Si cuantificamos éste incremento, la proporción entre la incidencia (prevalencia) de los cerdos expuestos y el factor y la incidencia de los cerdos que no son expuestos puede ser calculada. Ésta proporción se conoce como riesgo relativo. A mayor riesgo relativo, más fuerte la asociación entre el factor de riesgo y la enfermedad.

Cuando dos o más factores de riesgo actúan simultáneamente, el riesgo total relativo puede ser mayor que el riesgo relativo de los factores individuales (Mousing y col. 1990).

Los riesgos relativos deben de evaluarse con precaución, para aquellas asociaciones que pueden ser confundidas por otros factores.

Diversos estudios epidemiológicos han indicado una correlación positiva en piaras con prevalencia para neumonía y rinitis atrófica. Ésta asociación revela que los dos procesos patológicos tienen en común los mismos factores externos de desencadenamiento del proceso de enfermedad, y no que una de las enfermedades predisponga a la otra. De hecho no existe evidencia de que los animales que sufran alguna de estas enfermedades sean más susceptibles a la otra, esto cuando los estudios

de correlación incluyen a animales de la misma piara (Madec y Kobisch 1984; Straw 1986).

1.2.3.1.4.2 Infección respiratoria en individuos y en piaras.

El tracto respiratorio superior es el hábitat natural para millones de microorganismos comensales, incluyendo virus y bacterias. La flora comensal puede tener un efecto favorable en el hospedador, manteniendo controlado el número de agentes patógenos. No existe una distinción entre microorganismos comensales y potenciales microorganismos patógenos. Diversos estudios catalogan al mismo microorganismo como comensal o como patógeno. Por ejemplo *Mycoplasma flocculare*, *Mycoplasma hyorhinis* y *Haemophilus parasuis*, son un grupo de microorganismos que se aíslan frecuentemente del tracto respiratorio superior y en el árbol bronquial de cerdos sanos.

Se examinó la flora bacteriana en cerdos SPF, vivos y sanos de entre 20 a 30 Kg. Las bacterias que se encontraron fueron obtenidas por lavado bronquial y pertenecían a dos o tres especies, la mayoría de ellas estreptococos (no hemolíticos, α hemolíticos), estafilococos, *Escherichia coli*, *Klebsiella* y raramente aislaron a *Arcanobacterium pyogenes*, *Haemophilus parasuis* y *Bordetella bronchiseptica*. Nunca se aisló *Pasteurella multocida*, del árbol bronquial de los cerdos sanos.

Haemophilus parasuis y *Mycoplasma hyorhinis* se detectaron en lavados bronquiales de cerdos convencionales en un 40 % de las ocasiones (Castrick y col. 1990). Møller y Killian en 1990, encontraron que existe un espectro muy amplio de bacterias del grupo Pasteurellaceae dependientes del factor V que las reconocidas en la actualidad, probablemente de baja patogenicidad o no patógenas.

1.2.3.1.5 *Haemophilus parasuis* y *Mycoplasma hyorhinis*

Haemophilus parasuis y *Mycoplasma hyorhinis*, se comportan como comensales, debido a que su patogenicidad es neutralizada por la defensa respiratoria. En animales altamente susceptibles tanto *Haemophilus parasuis* como *Mycoplasma hyorhinis* pueden volverse patógenos (Nielsen y Danielsen 1975), resultando en una enfermedad sistémica severa (poliserositis, polisinovitis, meningitis).

Mantener el fino balance entre la población animal y los agentes patógenos evidentemente requiere que todos los cerdos sean puestos en contacto de manera temprana con los agentes patógenos. Los brotes ocurren cuando los mecanismos de infección normal no trabajan adecuadamente, debido principalmente a la restricción de contacto entre individuos. Por ejemplo, en piaras pequeñas, en granjas con destetes muy tempranos o con restricciones fuertes entre animales de diferentes

edades, así como en piaras SPF establecidas originalmente por medio de cerdos obtenidos por cesárea y desprovistos de calostro (CDCD por sus siglas en ingles) (Nielsen y Danielsen 1975; Smart y col. 1989).

1.2.3.1.6 *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Mycoplasma hyopneumoniae*, pueden ser considerados como representantes de diferentes tipos de microorganismos, en donde son comunes a nivel de piara, pero se aíslan raramente de individuos sanos (Friis 1974; Castryck y col. 1990). Su presencia ésta normalmente asociada a enfermedad, más de tipo subclínico que clínica, sobretodo en la etapa en que la inmunidad pasiva de los lechones se convierte en inmunidad activa.

Estos dos grupos de microorganismos se comportan de diferente manera, especialmente cuando existe un estado de debilidad inmune, que se da entre la transición entre inmunidad pasiva e inmunidad activa, y se da por diferentes razones.

1.- *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Mycoplasma hyopneumoniae*, tienen una mayor patogenicidad que *Haemophilus parasuis* y *Mycoplasma hyorhinis*.

2.- Es conocido que *Haemophilus parasuis* y *Mycoplasma hyorhinis*, invaden el epitelio nasal y traqueobronquial en etapas muy tempranas de edad de los lechones (Ross 1984). Esto facilita grandemente el desarrollo gradual de la inmunidad activa, bajo la protección de anticuerpos calostrales, una situación que beneficia tanto al hospedador como al patógeno. El hospedador se protege continuamente contra el patógeno y el patógeno es aceptado por el hospedador.

3.- El sitio donde *Haemophilus parasuis* y *Mycoplasma hyorhinis*, tienen verdaderamente sus propiedades patógenas (pleura, pericardio, peritoneo, meninges, y cavidades articulares entre otras) están fuera del tracto respiratorio. Con ello se ve un claro efecto de barrera física entre el sitio efector del patógeno y el sitio de residencia. En contraste, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Mycoplasma hyopneumoniae*, son fácilmente transportados del medio ambiente a su sitio de ataque por la inhalación de aire el cual los deposita en el epitelio nasal y en epitelio tonsilar.

Finalmente la habilidad de ciertas cepas de baja patogenicidad, para generar anticuerpos protectores contra las cepas más patógenas pero cercanas genéticamente, como se demostró para *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Nielsen 1988), debe de ser considerada. En conclusión, a nivel de piara la constante presencia de patógenos no puede ser permanentemente excluida y creemos que la presencia de *Haemophilus parasuis* y *Mycoplasma hyorhinis* en las edades adecuadas es ventajosa para la piara. Sin embargo, la presencia de patógenos como *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Mycoplasma hyopneumoniae*, nunca es benéfica para la piara.

El grupo de microorganismos "benéficos" respiratorios incluye especies de *Haemophilus* "minor group", *Bordetella bronchiseptica*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, algunas cepas no toxigénicas de *Pasteurella multocida* y algunas cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. En contraste las cepas más patógenas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Pasteurella multocida*, son altamente desventajosas, sobre todo las toxigénicas, debido a que las infecciones de la piara normalmente se traducen en episodios de problemas respiratorios severos.

Pasteurella multocida probablemente es el invasor más frecuente y dañino del pulmón del cerdo. Sin embargo ésta bacteria es un típico invasor secundario (Amass y col. 1994). Aún las cepas más patógenas no pueden infectar a los pulmones sanos a diferencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Bordetella bronchiseptica* produce solo una neumonía discreta en cerdos convencionales de 7 días de edad (Lambotte y col. 1990) pero en cerdos gnotobióticos la infección causa una neumonía severa y de larga duración (Underdahl y col. 1982).

1.2.3.2 Interacciones entre agentes infecciosos.

La enfermedad clínica es difícil que sea producida por la infección de un solo agente patógeno. Como regla varios patógenos están involucrados normalmente. Un patógeno actúa como agente disparador, el cual permite que agentes secundarios actúen, esto lo hace reduciendo los mecanismos de defensa del hospedador de manera local o sistémica.

Generalmente estos patógenos predisponentes son virus o micoplasmas, los agentes secundarios son otras bacterias. Por ejemplo la susceptibilidad a *Actinobacillus pleuropneumoniae*, se incrementa al existir previamente una infección con el virus de la influenza (Scatozza y Sidoli 1986) o al virus de Aujeszky (Lai y col. 1986).

Cerdos infectados con *Mycoplasma hyopneumoniae*, presentan una resistencia disminuida contra *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Yagihashi y col. 1984), en otro estudio (Kubo y col. 1995) *Mycoplasma hyorhinis*, incrementó la severidad de las lesiones pulmonares en cerdos infectados

con PRRS. Van Reeth y col. (1994) encontraron una mayor patogenicidad al tener una infección dual con PRRS e Influenza, que al solo estar infectados con uno solo de los virus. En la cavidad nasal *Bordetella bronchiseptica*, actúa normalmente como un factor predisponente, facilitando la invasión y replicación de cepas toxigénicas de *Pasteurella multocida* (Pedersen y Barfod. 1981).

Las lesiones causadas por los agentes predisponentes son generalmente leves y sin impacto clínico. También es bien conocido por experiencias en campo que las infecciones causadas por el virus de la influenza o el virus de la Enfermedad de Aujeszky, son raramente seguidas por severas complicaciones neumónicas, en piaras donde *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Mycoplasma hyopneumoniae*, están ausentes (Piaras SPF), lo cual se observa en las piaras donde estos últimos patógenos están presentes.

Como regla la presencia de un patógeno intensifica la proliferación de otro, pero el efecto inverso también se ha podido demostrar. En un estudio seroepidemiológico, Mousing (1993) examinó 4800 cerdos sacrificados en rastro para encontrar evidencia serológica contra *Actinobacillus pleuropneumoniae* tipo 2 y 6, *Haemophilus parasuis* e Influenza Porcina (H1N1, con las variantes americanas y europeas). La interrelación entre estas 5 infecciones respiratorias demuestra el riesgo relativo de confirmar una infección cuando el cerdo posee anticuerpos contra otro agente.

La mayoría de las infecciones parecen estar asociadas positivamente con *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 2, excepto para *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 6. La explicación probable a esto es que las especies de *Actinobacillus pleuropneumoniae* comparten antígenos que provocan la formación de anticuerpos con protección cruzada (Nielsen 1988). El efecto inverso fue demostrado por las dos variantes del virus de la Influenza. La prevalencia de la pleuritis crónica se incrementó de un 12.5% en los cerdos libres a las 5 infecciones mencionadas a más de un 60% en los cerdos infectados con 4 de los 5 agentes infecciosos.

La replicación de los agentes patógenos se concentra en las instalaciones de cerdos en crecimiento, lo cual actúa como un generador de patógenos para la pira completa. De éstos, la pira reproductora es periódicamente infectada. Éste mecanismo explica por que es más sencillo controlar las enfermedades respiratorias en piaras donde se comercializan todos los cerdos en crecimiento, que en aquellas donde se realiza el ciclo completo.

1.3 Género: *Haemophilus*.

1.3.1 Especies: *parasuis*.

1.3.1.1 Antecedentes.

El Género *Haemophilus*, debe su nombre debido a la peculiaridad de que sus miembros necesitan de uno o algunos de los factores de crecimiento presentes en la sangre (Bakos 1955), son un grupo de bacterias Gram negativas, no móviles, se comportan como aerobios o anaerobios facultativos que pueden ser encontradas en diferentes procesos inflamatorios. Las enfermedades asociadas a éste grupo son diversas y pueden afectar a animales domésticos y al humano, en los cuales pueden producir neumonías, septicemia, meningitis, artritis, abscesos cerebrales, metritis, abortos, vaginitis, poliserositis, y balanopostitis. La mayoría de los miembros de éste grupo se pueden encontrar en las membranas mucosas, como flora normal aparentemente no patógena.

1.3.1.2 Definición de la enfermedad.

La enfermedad de Glässer o poliserositis infecciosa porcina, es una enfermedad que a lo largo de las décadas se le ha contemplado como una afección esporádica, asociada a situaciones pos-stress, la cual afecta principalmente a cerdos de 2 semanas a 4 meses de edad (Biberstein y col. 1977) en el caso de cerdos convencionales, pero en granjas con un elevado grado de sanidad (SPF.) o en las que se maneja destete precoz o destete precoz medicado (SEW, MEW) (Kielstein, 1991) la enfermedad se puede convertir en una afección explosiva, produciendo una elevada morbilidad y mortalidad en todas las etapas de producción dentro de la granja, según Boh y Sheryl (1994), en donde puede causar poliserositis, poliartritis, miositis, septicemia, meningitis y muerte (Boh y Sheryl 1994).

1.3.1.3 Agente etiológico.

Haemophilus parasuis, es el agente causal de la enfermedad de Glässer o poliserositis artritis infecciosa porcina, el cual es aislado frecuentemente de las secreciones nasales de cerdos aparentemente sanos, en donde se sabe que es una de las bacterias que colonizan más tempranamente la mucosa respiratoria, donde la mayoría de los cerdos se infectan por el microorganismo alrededor del día 10-14 de edad (Kielstein 1991). Posiblemente uno de los microorganismos que colonizan más tempranamente la mucosa respiratoria de los cerdos es el *Streptococcus suis* (Kielstein 1991).

En la actualidad se realizan estudios de hibridación de DNA para determinar si efectivamente éste microorganismo pertenece a éste género o tiene que ser reubicado (Hartmann y col. 1995), así mismo se sabe que

hay 15 serotipos diferentes del microorganismo en donde un porcentaje importante de aislamientos que corresponden bioquímicamente a *Haemophilus parasuis* son no tipificables (Holmegren 1996) indicando esto que posiblemente el número de serotipos sea mayor.

1.3.1.3.1 Distribución en la naturaleza.

Debido a que a lo largo de la historia se ha conceptualizado al *Haemophilus parasuis*, como un microorganismo que actúa en forma secundaria y debido a su naturaleza heterogénica y a la dificultad para manejar las muestras clínicas y lograr el primoaislamiento, no se sabe a ciencia cierta si es un microorganismo ubicuo. Gracias a los estudios realizados para diferenciar los serotipos existentes se sabe que ésta distribuido en EE.UU., Alemania, Brasil, Canadá y Australia, en donde los serotipos más comunes son el 5, 4, 13, 14, 2, 12, (Kielstein 1992) tomando importancia debido al porcentaje de aislamientos el serotipo 5 y 4.

En México se han realizado diversos estudios y aislamientos en donde desafortunadamente solo se ha podido comprobar la presencia de *Haemophilus parasuis* en casos clínicos, mediante el aislamiento e identificación bioquímica, sin poder llegar a la serotipificación, motivo por el cual se desconoce que serotipos pueden estar presentes en el hato nacional.

1.3.1.3.2 Características morfológicas y tintoriales.

Son bacterias Gram negativas, de forma pleomórfica que van desde pequeños cocobacilos a bacilos largos que semejan cadenas, no presenta flagelos y no existen referencias que indiquen la presencia de fimbrias de algún tipo. La mayoría de los aislamientos presentan cápsula la cual se puede observar por la tinción de Maneval, sin embargo ésta característica puede variar dependiendo del medio de crecimiento utilizado y el pasaje *in vitro*. Algunos autores refieren la presencia o ausencia de cápsula dependiendo del serotipo aislado, así como del lugar o muestra clínica de donde se realizó el primoaislamiento, demostrando que la heterogeneidad fenotípica del microorganismo se debe por la gran variedad de serotipos así como la presencia o no de material capsular, tipo de proteínas de pared celular y las proteínas externas de la membrana, esto junto con las diferencias genotípicas de los aislamientos pueden conformar las diferencias entre el potencial de virulencia existente entre los diferentes serotipos (Kielstein y col. 1992).

1.3.1.3.3 Características de cultivo.

Haemophilus parasuis, es una bacteria dependiente del factor V o NAD, no dependiente del factor X o hemina, el cual crece en medios enriquecidos adicionándoles 0.016% de NAD, como son el medio BHI, PPLO, base Agar sangre, medio de Frey para *Mycoplasma*, o en su caso mediante la obtención del NAD por la producción de una cepa nodriza de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, algunos *Bacillus*, *Pseudomona* y *Corinebacterias*, observándose en éstos el fenómeno conocido como satelitismo. Para poder realizar en ciertos casos un primoaislamiento adecuado se utilizan medios selectivos como es el agar PPLO, agar BHI o agar chocolate, a los cuales se les puede adicionar 300 mg, de bacitracina por litro y tener una cepa nodriza de las bacterias productoras de NAD, para facilitar su aislamiento e inhibir el crecimiento de otras bacterias que pueden estar como contaminantes en las muestras clínicas (Hartmann y col. 1995). Las colonias en agar PPLO con cepa nodriza después de 24 horas de incubación a 37° C, son circulares de aproximadamente 1-2 mm de diámetro, blanquecinas o grisáceas semitransparentes, las cuales al contacto con el asa de platino tienen una consistencia acuosa y no penetran el agar (Kielstein y col. 1992), como es el caso de algunas cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

En lo que respecta a las pruebas bioquímicas se utilizan las rutinarias con la salvedad de adicionar el NAD para obtener un buen crecimiento. Las pruebas bioquímicas más utilizadas para *Haemophilus parasuis* y otros integrantes del grupo HAP (*Haemophilus-Actinobacillus-Pasteurella*), se observan en el cuadro siguiente.

Características bioquímicas de las especies de *Haemophilus-Actinobacillus* aislados de cerdos.

Características bioquímicas	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	<i>Haemophilus</i> taxon "minor group"	<i>Haemophilus parasuis</i>	Taxón D	Taxón E	Taxón F	Taxón C
% de cepas positivas a las características bioquímicas							
Factor V	100	100	100	100	60	100	100
Factor X	0	0	0	0	0	0	0
Indol	0	0	0	0	0	100	0
Urea	100	100	0	0	0	0	0
Hemólisis	77	0	0	0	0	0	0
CAMP	100	0	0	0	0	0	0
Catalasa	12	13	100	0	0	100	100
Oxidasa	71	78	53	59	60	82	100
β -Galactosidasa (ONPG)	100	100	100	100	80	100	0
Neuroaminidasa	0	0	86	68	60	0	0
Nitratos	100	100	100	96	30	100	100
Nitritos	100	48	0	0	0	0	100
H ₂ S	94	100	82	50	30	100	100
Arabinosa	0	0	0	88	0	0	100
Ribosa	100	9	93	82	0	71	100
Xylosa	88	30	0	50	0	25	0
Galactosa	100	87	100	98	0	100	100
Glucosa	100	100	100	100	30	100	100
Lactosa	6	91	0	96	0	32	0

Tomado y adaptado de Miller y col. (1990b).

1.3.1.4 Resistencia a los agentes químicos y físicos.

El *Haemophilus parasuis* al igual que la mayoría de los integrantes de la Familia *Pasteurellaceae* son microorganismos que han perdido parte de la información genómica de sus ancestros de vida libre, sucedido durante la adaptación filogenética a la vida parasitaria (Lara y col. 1996), motivo por el cual la resistencia a los factores físicos y químicos se ha reducido, entendiéndose que es una bacteria sumamente delicada a la deshidratación, radiación solar y acciones de la mayoría de los desinfectantes aún en mínimas concentraciones, razón por la que las muestras enviadas a los laboratorios para la realización de aislamientos y tipificación deben de ir en las mejores condiciones de temperatura, en medio de cultivo de transporte adecuado y llegar a su destino en el menor tiempo posible.

1.3.1.5 Mecanismos de virulencia.

En el caso de los mecanismos de virulencia de la familia *Pasteurellaceae*, se han realizado estudios muy profundos en algunos de sus miembros como el *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Pasteurella multocida* y *P. Haemolytica*, desafortunadamente y debido a que la enfermedad de

Glässer, era considerada como esporádica y asociada a problemas de stress, no se han realizado una gran cantidad de estudios para determinar los mecanismos de virulencia del *Haemophilus parasuis*, aunado a esto la gran diversidad fenotípica, genotípica y la dificultad para realizar el aislamiento de dicha bacteria han complicado su estudio.

1.3.1.5.1 Antígenos.

1.3.1.5.1.1 Cápsula.

Como es sabido la cápsula es la parte más externa de la bacteria, el caso de *Haemophilus parasuis*, no es la excepción, se ha encontrado que algunos de los serotipos actuales son capsulados y que presumiblemente juegue un papel importante en la patogenia de la enfermedad. Desafortunadamente las conclusiones de los experimentos realizados son contradictorias, pues algunos autores indican que solo las cepas no capsuladas son patógenas, mientras que otros proponen que la presencia o ausencia de la cápsula es debida al medio utilizado para el primoaislamiento, el número de pasajes *in vitro*, así como la muestra de donde se ésta realizando el aislamiento. En cuanto a la composición bioquímica de los polisacáridos que la conforman, los cuales aparentemente son un factor crítico en la virulencia y patogenia de la enfermedad se supone que son similares a las que presentan las demás bacterias de su género, son ácidas, de alto peso molecular, con polisacáridos heterogéneos, en donde se presentan unidades repetitivas de dos o tres azúcares o amino azúcares como el glicerol, acetil fosfato, ácido carboxílico o urónico. Cada unidad es un disacárido, y la carga neta negativa de la cápsula es conferida por los grupos fosfato y el ácido urónico. De igual forma son relativamente inertes biológicamente, no tóxicas, no activan al complemento en ausencia de anticuerpos específicos, no inducen inflamación y pobremente inmunogénicas (Lara y col. 1996).

1.3.1.5.1.2 Liposacáridos.

Son macromoléculas de alto peso molecular integrantes de la membrana externa de todas las bacterias Gram negativas. Generalmente la estructura básica es similar teniendo variaciones especialmente en los azúcares externos. La composición química y por lo tanto la actividad biológica y las características antigénicas de los liposacáridos dependen de los siguientes puntos:

- a) el tipo de bacteria de la cual se aísla el liposacárido
- b) el método de extracción y purificación empleado
- c) la pureza de la preparación
- d) el medio en el cual es resuspendido

Estas variables en la mayoría de las ocasiones son las responsables de que los resultados obtenidos en algunos experimentos no se puedan repetir y por lo tanto tener conclusiones contradictorias (Maes y col. 1996).

Numerosas investigaciones han estudiado la naturaleza química y física de la porción del polisacárido del liposacárido de la mayoría de los integrantes del grupo HAP. Se han podido establecer diferencias en la estructura básica de estos polisacáridos estableciendo así diferentes serotipos. Éste proceso se está acelerando gracias a la utilización de la espectrofotometría de masas y la resonancia magnética nuclear, cuyos estudios esperamos pronto sean publicados y ayuden a explicar las características e implicaciones inmunes del liposacárido del grupo HAP. Esto es importante ya que debido a las posibles diferencias químicas y físicas del liposacárido entre las cepas integrantes del grupo HAP, puede surgir la base para explicar las diferencias existentes entre los serotipos de un género en particular (Maes y col. 1996).

Genéricamente la porción del polisacárido del liposacárido se divide en dos regiones. La región más externa (antígeno "O") ésta compuesta por unidades repetitivas de oligosacáridos de diferente longitud, debido al gran número de compuestos que lo forman y a su vez a la gran capacidad de formar diferentes uniones entre ellos, se conforma una estructura única que se llama antígeno somático u "O", el cual normalmente sirve para determinar el serotipo de una cepa del grupo HAP.

El género *Haemophilus* spp aparentemente es el único integrante del grupo HAP en el que se pierden las cadenas laterales del antígeno "O". No se han analizado todas las especies del género, pero se utiliza el término de lipooligosacárido en lugar de lipopolisacárido. Existe un polimorfismo aleatorio que puede ocurrir tanto *in vivo* como *in vitro*. Las implicaciones que acarrea éste polimorfismo son aún inciertas, pero se supone que pueden servir para evadir las respuestas antígeno específicas del huésped (Maes y col. 1996). Una de las actividades biológicas del lipooligosacárido más importantes en el laboratorio y clínicamente es que gelifica amebocitos del género *Limulus*, y es pirógeno.

1.3.1.5.1.3 Proteínas de membrana externas.

La verdadera importancia de estas proteínas y su posible acción en la patogenia y capacidad de virulencia del *Haemophilus parasuis*, no está bien determinada, se sabe que una proteína de 42 kDa cruza serológicamente con la proteína de 40 kDa de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y con la de 38 kDa de *Pasteurella multocida*, donde las proteínas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Haemophilus parasuis*, son no modificables a una temperatura de 37° C y la de *Pasteurella multocida* sí. Por homología de grupos amino terminales se cree que

están relacionadas a porinas, las cuales desempeñan la función de canales de paso para moléculas hidrofílicas pequeñas y que probablemente se encuentran involucradas en el proceso infeccioso como la de *Pasteurella multocida*, en donde se sabe que los anticuerpos dirigidos en contra de ésta son protectores. Posteriores investigaciones del papel que juegan estas proteínas en cuanto a patogenicidad e inmunogenicidad son necesarias (Miniats y col. 1986).

1.3.1.5.1.4 Pared celular.

En cuanto a la pared celular del *Haemophilus parasuis*, se sabe que existen dos patrones electroforéticos diferentes (PAGE tipo I y II), en donde se sabe que la mayoría de los aislamientos de procesos infecciosos realizados en Dinamarca son cepas no capsuladas y que corresponden al PAGE tipo II. (Møller y Killian, 1990).

1.3.1.5.1.5 Antígenos termoestables.

Mediante el uso de antígenos termoestables se ha realizado la actual clasificación por serotipos del *Haemophilus parasuis*, en donde se han podido determinar 15 serotipos diferentes, utilizando una prueba de precipitación en agar-gel (AGPT), indicando que un porcentaje de aislamientos que corresponden bioquímicamente a *Haemophilus parasuis*, no se han podido serotipificar, indicando esto que puede existir la posibilidad de la existencia de más serotipos o la posibilidad de que algunas cepas hallan perdido o no expresen consistentemente los antígenos tipo específicos. Se cree que el antígeno termoestable que se utiliza en la prueba de precipitación en agar gel es un polisacárido y que puede estar asociado con la cápsula o con proteínas externas de membrana. Los 15 serotipos actuales integran de una forma más adecuada las clasificaciones anteriores existentes, como se ve en el cuadro siguiente.

Serotipos de *Haemophilus parasuis*.

SEROTIPO POR AGPT	SEROTIPOS ANTERIORES
1	1*
2	2*, A**
3	3*
4	4*
5	5*, B**
6	6*
7	7*
8	C**
9	D**, Jena 12****
10	Jena 10****
11	Jena 11****, ND2****
12	Jena 6****, ND5****
13	ND4****
14	ND3****
15	ND1****

Tomado y modificado de Kielstein and Rapp-Gabrielson, 1992.

*Morozumi, T., and Nicolet. 1996. Morphological variations of *Haemophilus parasuis* strains. J. Clin. Microbiol. 23:138-142.

**Bakos, K. 1955. Studien über *Haemophilus suis*, mit besondes Berücksichtigung der serologischen Differenzierung sein Stämme, D.V.M. dissertation. University of Stockholm, Stockholm, Sweden.

***Kielstein, P. 1991. Zur Glässerschen Krankheit des Schwein Untersuchungen über Zusammenhänge zwischen serologisch Eigenschaften, Kapselausbildung und Virulenz von *Haemophilus-parasuis*-Stämmen. Monatsh. Veterinärmed. 46:137-140.

****Rapp-Gabrielson, V. J., and D. Gabrielson. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars among isolates from swine. Am. J. Vet. Res., 1992.

En el cuadro anterior se puede observar como el serotipo 2 actual, corresponde al serotipo 2 del esquema de Morozumi y Nicolet y al serotipo B de Bakos, el serotipo 3 corresponde al serotipo 3 de Morozumi y col., el serotipo 4 corresponde al serotipo 4 de Morozumi y col., el serotipo 5 corresponde al serotipo 5 de Morozumi y col. y al B de Bakos, el serotipo 6 es el 6 de Morozumi, el 7 corresponde al 7 de Morozumi y col., el 8 corresponde al C de Bakos, el 9 es el D de Bakos y el Jena 12 de Kielstein y col., el 10 es el Jena 10 de Kielstein col., el 11 corresponde al Jena 11 de Kielstein col. y al ND2 de Rapp-Gabrielson col., el 12 es el Jena 6 de Kielstein col. y el ND5 de Rapp-Gabrielson col., el 13 es el ND4 de Rapp-Gabrielson col., el 14 es el ND3 de Rapp-Gabrielson col., y el serotipo 15 corresponde al ND1 del esquema de Rapp-Gabrielson col.

Por estudios realizados en Alemania se sabe que los serotipos 1, 5, 10, 12, 13 y 14, en cerdos libres de patógenos específicos (SPF) causan muerte o están moribundos a los 4 días posdesafío, los serotipos 2, 4 y 15 producen poliserositis pero no la muerte a los 4 días posdesafío, el serotipo 8 solo produce signos y lesiones leves, mientras que los serotipos 3, 6, 7, 9 y 11 no producen signos clínicos ni lesiones en los cerdos desafiados. Resultados muy importantes a tomarse en cuenta en las medidas de vacunación y control de la enfermedad.

En estudios donde se han realizado homologías de DNA en cepas de referencia y de campo se ha encontrado que pueden existir subespecies dentro de un mismo serotipo, lo que se ha demostrado con el serotipo 5, por lo que se indica que posiblemente no sea un adecuado marcador el serotipo para estudios epidemiológicos (Morozumi y col. 1986).

1.3.1.5.1.6 Toxinas.

Desafortunadamente se observa que en la bibliografía existe una amplia gama de trabajos donde se investigan los posibles atributos de virulencia, serotipos, vacunación y protección cruzada en las vacunaciones y desafíos, pero casi no hay referencias de la producción de toxinas, epidemiología, inmunología y patogénesis. Razón por la cual el campo de la investigación en éste punto debe de fortalecerse en el futuro.

1.3.1.6 Interacciones patógenas.

Las bacterias del género *Haemophilus spp.*, han sido descritas como protagonistas de infecciones severas en el cerdo. Por lo menos cuatro especies de *Haemophilus* (*H. suis*, *H. parasuis*, *H. parainfluenza* y *H. parahemolyticus*) han sido aislados del tracto respiratorio. Estudios recientes han demostrado que la morbilidad y mortalidad dependen del estado inmune de la granja, grandes poblaciones de cerdos mantenidos como libres de patógenos (SPF) o con una alta sanidad tienden a ser las más afectadas. La falta de una temprana exposición al patógeno limita el desarrollo de una buena inmunidad. La carencia de anticuerpos puede llegar a ser un factor predisponente para la ocurrencia de un brote.

Existen evidencias de las interacciones entre diferentes microorganismos en la presentación de neumonías.

Matthews y Pattison (1961) demostraron la interacción entre el virus de la Fiebre Porcina Clásica (FPC) y *Haemophilus parainfluenzae*, por su parte Pijoan y Ochoa (1978) demostraron la interacción y sinergia existente entre el virus vacunal de la FPC y *Pasteurella multocida*, En 1984 se demostró lo mismo entre el Virus de la Enfermedad de Aujeszky y *Pasteurella multocida*, Falcón en 1989 demostró la sinergia entre el Virus de la enfermedad de Aujeszky y *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Ciprián y col., en 1988 demostraron la interacción entre *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Pasteurella multocida*, Yagihashi y col. (1984) lo demostraron entre *M. hyopneumoniae* y *Actinobacillus pleuropneumoniae* y en 1994 Cruz y col., lo demuestran en México, entre *Mycoplasma hyopneumoniae* *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Como se ha visto, la relación entre patógenos llamados primarios (virus y micoplasmas), con agentes secundarios y aún con los mismos primarios existe en realidad, produciendo esto un aumento en la severidad de la enfermedad y por lo tanto mayor pérdida económica para el porcicultor.

Luego de observar los datos anteriores y con el hecho de que la enfermedad se puede confundir con otros cuadros neumónicos, siempre y cuando no presente lesiones sistémicas, surge la pregunta de si no existe una interacción bacteriana que facilite o agrave la presentación de la enfermedad de Glässer.

La Poliserositis fibrinosa es uno de los cuadros más descritos a nivel de campo relacionados con frecuencia a la enfermedad del PRRS. El aumento en la frecuencia de aislamiento de *Haemophilus parasuis*, asociado a granjas endémicamente infectadas con el virus nos lleva a suponer una posible interacción entre el virus del PRRS y *Haemophilus parasuis*.

Esta interacción; ya trató de ser demostrada en forma experimental encontrándose que los animales inoculados solamente con *Haemophilus parasuis*, presentaron una poliserositis más severa y generalizada caracterizada por depósitos y adherencias fibrinosas del pulmón a la cavidad torácica. Los lechones infectados con el PRRSv y *Haemophilus parasuis*, presentaron lesiones menos severas y más localizadas. El grupo inoculado con el virus solamente o el grupo control no presentaron lesiones macroscópicas. Éste es el primer trabajo experimental que examina la posible interacción entre el virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino y *Haemophilus parasuis*. La interacción entre el virus del PRRS y *Haemophilus parasuis*, bajo las condiciones experimentales aquí señaladas supondría un doble efecto.

- 1) Destrucción local de macrófagos alveolares que ocasiona una rápida proliferación de la bacteria, facilitando la septicemia y muerte de algunos animales por choque séptico

- 2) Los animales sobrevivientes tuvieron tendencia a desarrollar serositis localizada como lesiones bacterianas y un incremento en la respuesta inmune a nivel sistémico que minimiza la severidad en la presentación de lesiones.

En resumen, la infección de cerdos susceptibles con el virus del PRRS, seguida por una infección intratraqueal con *Haemophilus parasuis*, no resultó en un incremento en la poliserositis. Estos hallazgos contradicen las observaciones de campo en donde se reporta clínicamente que el virus produce un aumento en la ocurrencia de poliserositis debida a *Haemophilus parasuis*. Otros factores de manejo como mezclar cerdos de distintos orígenes, establecimiento de granjas de alta sanidad y falta de inmunidad, y otros factores de riesgo para la enfermedad deben ser considerados en las observaciones de campo. De igual manera la interacción entre *Haemophilus parasuis* y *Mycoplasma hyopneumoniae* y lo *Mycoplasma hyorhinis*, en cerdos convencionales fue estudiada encontrándose que estadísticamente no hubo diferencias significativas entre los grupos experimentales tomando en cuenta solamente el

porcentaje de lesión pulmonar. Sin embargo al realizar una evaluación de los signos clínicos junto con todas las lesiones encontradas el resultado de la interacción pudiera ser significativo, motivo por el cual es necesario que los estudios en donde se traten de demostrar las posibles interacciones del *Haemophilus parasuis* con otros agentes patógenos se sigan llevando a cabo.

1.3.1.7 Inmunidad y biológicos vacunales.

El desarrollo de estrategias para reducir el impacto económico de las enfermedades en las explotaciones porcinas es y ha sido una prioridad para la industria porcina durante largo tiempo.

Una vez que alguna enfermedad entra a un hato de producción es sumamente difícil su eliminación y si a esto aunamos que ciertas enfermedades son difíciles de detectar cuando se encuentran en forma subclínica, la situación se complica aún más. Razón por la cual se han utilizado animales SPF, los cuales provienen de cerdos gnotobióticos, para tener hatos con un elevado nivel de sanidad. Desafortunadamente esto implica tener extremas medidas de bioseguridad, para evitar posibles infecciones de microorganismos que se consideran patógenos, como lo es *Actinobacillus pleuropneumoniae*, virus de la FPC, virus de la enfermedad de Aujeszky, y PRRS, entre otros.

De la misma forma existen patógenos a los que se les consideraba de baja incidencia o esporádicos y que en cerdos convencionales no producían aparentemente daños o eran mínimos, como lo son *Haemophilus parasuis* y *Streptococcus suis*, los cuales han causado grandes pérdidas económicas en éste tipo de hatos o en aquellos en donde se mezclan cerdos SPF, con cerdos convencionales, donde éste tipo de microorganismos son parte de la flora normal. Lo cual puede resultar en una poliserositis fulminante en los animales SPF, debido a una infección con *Haemophilus parasuis*. Aún y cuando hay animales que sobreviven a ésta enfermedad presentarán pobres niveles de conversión carnica como resultado de los efectos de la enfermedad en forma crónica y a sus lesiones (Morozumi y col. 1986).

La inmunización en el caso de la enfermedad de Glässer, puede ser útil para lograr un control de ésta enfermedad. Existen reportes en donde se ha demostrado que la exposición natural y recuperación de la enfermedad brindan una protección cruzada entre casi todos los serotipos actuales. La vacunación es efectiva contra desafíos con serotipos homólogos a los utilizados para la elaboración de la vacuna. También se ha demostrado que una vacuna comercial que contiene los serotipos 4 y 5, ha brindado protección en cerdos CDCD (cerdos obtenidos por cesárea privados de calostro,) contra el desafío utilizando los serotipos 4, 5, 13 y 14, pero no contra los serotipos 2 y 12 (Morozumi y col. 1996; Boh y Sheryl 1994).

De igual forma se han realizado estudios en lechones SPF, encontrando resultados similares a los anteriores pero siempre indicando que la protección cruzada es solamente alcanzada para algunos serotipos. Esto se puede deber a la heterogeneidad que presenta en las cepas y en los serotipos el *Haemophilus parasuis*. Lo cual es una desventaja ya que se ha demostrado por huellas genéticas de DNA, (Boh y Sheryl 1994) que dentro de una misma granja pueden estar presentes hasta cuatro diferentes serotipos, también se ha demostrado que algunas cepas virulentas y serotipos de campo pueden no ser adecuados inmunógenos, por lo cual la utilización de una autobacterina puede resultar en una falla en la protección (Boh y Sheryl 1994).

Entonces la eficacia de inducir inmunidad cruzada por las bacterinas comerciales o las autógenas, todavía no es clara y amerita seguir llevando a cabo estudios tanto en animales bajo condiciones altamente controladas, como en ensayos realizados en el campo (Boh y Sheryl 1994).

En otro estudio se evaluó la inmunidad materna en los lechones de cerdas vacunadas y no vacunadas con una bacterina comercial, que incluía a los serotipos 4 y 5, en donde se encontró que los lechones provenientes de cerdas vacunadas y que eran desafiados con el serotipo 5 no mostraron signos clínicos y solo hubo indicios de neumonía ligera a la necropsia de los mismos, mientras que los provenientes de cerdas no vacunadas mostraron signología respiratoria y lesiones neumónicas en diferentes grados (Nielsen y Danielsen 1975). Esto nos indica que bajo condiciones experimentales los lechones provenientes de cerdas vacunadas están protegidos contra el desafío de cepas virulentas de *Haemophilus parasuis* serotipo 5. En donde ésta protección es evidente hasta las 4 semanas de edad (Nielsen y Danielsen 1975).

1.3.1.8. Diagnóstico microbiológico y epidemiología.

El método definitivo para llegar al diagnóstico de la enfermedad de Glässer es el aislamiento del *Haemophilus parasuis* a partir de tejidos o de hisopos. Ésta recuperación puede ser difícil en casos de campo y los aislamientos ser negativos aún y cuando se encuentren lesiones sugestivas de ésta enfermedad. Existe una gran variedad de enfermedades que se pueden confundir con ésta, como son las causadas por *Mycoplasma hyorhinis*, *Streptococcus suis* y algunas intoxicaciones como la de hierro dextran (Nielsen 1993). Por lo que métodos más sensitivos de diagnóstico deben de ser empleados (Boh y Sheryl 1994).

Se debe de proceder con una adecuada selección de las muestras que deben de ser enviadas al laboratorio, así como su manejo durante la toma y el envío al laboratorio para su análisis. De la misma forma la

identificación bioquímica es muy importante debido a que si no se realizan las pruebas adecuadas se podría confundir con *Actinobacillus pleuropneumoniae* o con otras especies de *Haemophilus* pertenecientes a los diferentes taxones existentes.

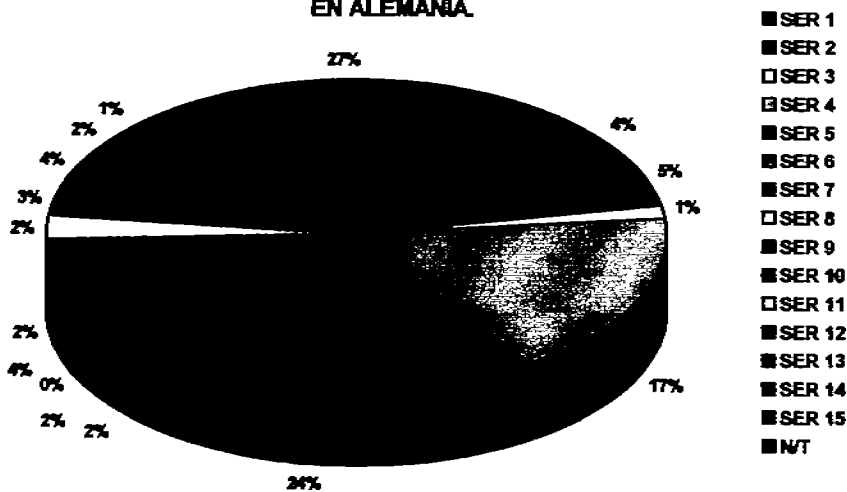
Los resultados de diferentes estudios indican que las muestras obtenidas de líquido peritoneal, cerebroespinal y fluidos pericárdicos son más adecuados que el envío de tejidos como el bazo y el pulmón (Trujano y col. 1994). Así mismo en medios de transporte convencionales es posible que se mantenga viable el *Haemophilus parasuis* durante 5 a 7 días a temperatura ambiente.

El estatus inmune del huésped o del hato es determinante en el potencial patogénico de la infección por *Haemophilus parasuis*.

1.3.1.9 Prevalencia de los serotipos.

En estudios realizados en EE.UU. y Alemania mediante el uso de la prueba de Precipitación en Agar-Gel (AGPT) se ha encontrado que los serotipos más comunes son el 5, 4, 13, 14, 2, 7, 1, 3, 6, 11 y 15 lo cual se puede observar en las siguientes gráficas.

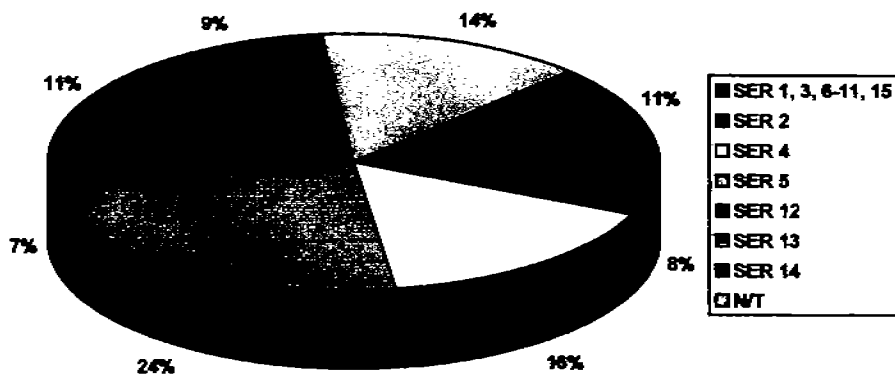
PREVALENCIA DE LOS SEROTIPOS DE *Haemophilus parasuis*
EN ALEMANIA.



N/T : no tipificables

Tomado de Kielstein and Rapp-Gabrielson, 1992.

PREVALENCIA DE SEROTIPOS DE *H. parasuis* en E.U.A.



N/T : no tipificables

Tomado de Swine Practitioner, 1995.

Con base en los estudios anteriores se observa que el serotipo 5 es el más frecuente en problemas de la enfermedad de Glässer, seguido por el

serotipo 4. Cabe indicar que en México no se han realizado estudios que indiquen el serotipo o serotipos más frecuentes en el hato nacional.

1.3.1.10 Métodos diagnósticos.

1.3.1.10.1 Pruebas inmunes.

Una de las dificultades para el correcto diagnóstico de *Haemophilus parasuis* es la carencia de métodos diagnósticos rápidos y sencillos, así como capaces de diferenciar los serotipos presentes, cuestión que es sumamente importante ya que se ha demostrado que pueden existir diferentes serotipos de la bacteria en una misma explotación y que como se sabe la protección de la mayoría de las bacterinas comerciales es serotipo específicas y que algunos serotipos de las cepas de campo no producen una inmunidad adecuada para ofrecer una protección real, razón por la cual algunas autobacterinas pueden no dar resultados satisfactorios.

Se sabe que existe la prueba de fijación del complemento la cual se usa para identificar algunos de los serotipos del *Haemophilus parasuis*, desafortunadamente es una prueba compleja, que no diferencia a todos los serotipos existentes, también existe una prueba serológica de ELISA para determinar si los cerdos que van a ser introducidos a una granja presentan anticuerpos contra el *Haemophilus parasuis*, pero ésta prueba solo ésta disponible en muy pocos laboratorios de diagnóstico privados en EE.UU.

Rapp-Gabrielson y col. (1999) indican la existencia de una prueba de inmunofluorescencia para detectar anticuerpos contra *Haemophilus parasuis*. De igual forma hay pruebas como ELISA que utilizan antígenos termoestables para determinar el serotipo de los aislamientos positivos de *Haemophilus parasuis* y la utilización de la Técnica de Precipitación en Agar-Gel (AGPT) para diferenciar los 15 serotipos actuales.

Desafortunadamente estas técnicas aún están disponibles en el país, por lo que es necesario realizar proyectos que lleven al desarrollo de pruebas diagnósticas sencillas capaces de realizarse en el campo y que puedan diferenciar los diferentes serotipos existentes en el país.

1.3.1.11 Resistencia y sensibilidad antimicrobiana.

Por trabajos realizados por Nicolet y col. (1992), se sabe que los antibióticos que pueden ser utilizados para el tratamiento en contra de *Haemophilus parasuis* son penicilina, ampicilina, trimetoprim con sulfaniamidas y tetraciclinas. También se ha reportado que los antibióticos menos efectivos en contra de *Haemophilus parasuis* son los aminoglucósidos y sulfaniamidas. Independientemente de los resultados

anteriores se sabe de otros trabajos en donde se han encontrado cepas resistentes a diferentes tipos de antibióticos como se observa en la siguiente tabla (Pijoan y Molitor 1992).

Porcentaje de resistencia a diferentes antimicrobianos

AGENTE ANTIMICROBIANO	% DE RESISTENCIA
Ampicilina	0.0
Enrofloxacin	0.0
Cefalotina	0.0
Ceftiofur	2.1
Penicilina	2.1
Sulfadiazolpiridazina	2.1
Gentamicina	4.3
Espectinomicina	4.3
Trimetoprim /sulfa	6.4
Amikacina	6.4
Eritromicina	10.6
Tetraciclina	14.9
Neomicina	21.3
Apralan	29.8
Clindamicina	40.4

Con base a los resultados observados se puede indicar que debido a su bajo costo y fácil adquisición en el mercado nacional, la familia de las penicilinas son los antibióticos de primera elección, en los brotes en los que se haya identificado *Haemophilus parasuis* como patógeno primario (Pijoan y Molitor 1992).

Pero También hay reportes alemanes que indican de la resistencia de cepas del *Haemophilus parasuis*, a la penicilina pero no al ceftiofur. En donde también se indica que la medicación con tetraciclinas vía el alimento puede ser no efectiva en el control de la enfermedad (Kielstein 1992).

Las medidas profilácticas de administración de antibióticos en granjas de cerdos SPF, no han demostrado un gran poder de eficiencia al no poder reducir la morbilidad y la mortalidad ante un brote de la enfermedad de Glässer, debido a que los efectos han sido poco benéficos y de corta duración. Por lo que posiblemente el sistema más adecuado de control de la enfermedad es mediante la medicación individual y el uso de bacterinas que incluyan el serotipo o serotipos involucrados en el brote y presentes en la granja.

No hay trabajos que indiquen la presencia de plasmidos que transmitan la capacidad de resistencia hacia algún o algunos de los antibióticos utilizados en la actualidad, motivo por el cual ésta posibilidad no debe descartarse.

1.4 NEUMONÍA ENZOÓTICA DE LOS CERDOS.

1.4.1 Introducción.

Ross (1984) en las memorias de las Asociación Americana de Especialistas en Cerdos menciona: "Las neumonías crónicas en el cerdo se pueden observar como un complejo producido por agentes infecciosos fuertemente influenciados por factores ambientales. *Mycoplasma hyopneumoniae*, es claramente el agente etiológico primario en muchas de estas neumonías crónicas; cuando éste microorganismo está ausente en los cerdos de crecimiento y finalización las neumonías crónicas son de poco impacto. La importancia del micoplasma puede ser sobrevaluada y se ha preferido caracterizar ésta neumonía como una enfermedad infecciosa clásica con determinados signos clínicos típicos y cambios morfológicos. El colocar así a ésta enfermedad dentro de la definición, puede entenderse, pero al igual que otras enfermedades que tienen en común la moderna explotación animal, la "neumonía micoplasmática porcina" (NMP) o "neumonía enzoótica" (NE) es claramente una enfermedad productiva, multifactorial y con muchas facetas aún desconocidas.

1.4.1.1 Papel de *Mycoplasma hyopneumoniae*

Se ha visto, desde hace tiempo que la neumonía enzoótica (NE) de los cerdos de engorda podía ser transmitida en forma experimental con filtrados libres de otro tipo de bacterias de muestras de pulmón neumónico. Si estos filtrados eran tratados con penicilina o sulfonamidas se mantenía la infectividad; por lo que se sugirió que el agente causal era un virus. Sin embargo, por evidencias posteriores, como son el tratar a los filtrados libres de bacterias con tetraciclinas, para inhibir la infección, el determinar su tamaño: 0.2 a 0.45 μm de diámetro y ser observados en preparaciones pulmonares teñidas con Giemsa, además de la exigencia para su crecimiento en medios libres de células se sugirió que el agente responsable no era un virus sino un micoplasma (Whittlestone 1979 y Armstrong 1982).

En forma independiente y casi simultáneamente, dos nombres de especie fueron propuestos para el micoplasma responsable de un tipo de neumonía en los cerdos: El nombre de *M. hyopneumoniae*, fue propuesto por los estadounidenses en 1965; la cepa tipo (por monotipificación) fue la número 11 (también conocida como VPP11), en el mismo año también los ingleses propusieron el nombre de *M. suisneumoniae*, al mismo agente causal de la neumonía enzoótica de los cerdos y la cepa tipo fue designada como la cepa J. Sin embargo, el Subcomité Internacional sobre la Taxonomía de Mycoplasmatales recomendó que la cepa J fuera aceptada como la Neotipo de *M. hyopneumoniae* con base en que las dos

cepas son indistinguibles por pruebas serológicas y biológicas (Rose y col. 1979).

1.4.2 Etiología.

Los micoplasmas son los más simples y diminutos organismos procariontes de vida libre que separan de las Eubacterias en una clase diferente: Los *Mollicutes* (Cuadro 1). En el cerdo se han reconocido diferentes micoplasmas y *Acholeplasmas* (Cuadro 2), *Mycoplasma hyopneumoniae* es el más importante por causar la Neumonía Enzoótica, enfermedad infecciosa del tracto respiratorio del cerdo. Por ello en el presente trabajo se describirán las características más relevantes de éste agente.

Cuadro 1.- Clasificación de los micoplasmas.

Orden *Mycoplasmatales*.

Familia I *Mycoplasmataceae* (Necesidad de estero)l

Hábitat: Hombre y animales.

Género I. *Mycoplasma* (64 especies).

Género II. *Ureaplasma* (2 especies), Actividad ureasa.

Familia II. *Acholeplasmataceae* (Sin necesidad de estero)l Hábitat: hombre y animales.

Género I. *Acholeplasma* (7 especies)

Familia III. *Spiroplasmataceae* (morfología espiral, necesidad de estero)l Hábitat, plantas, insectos.

Género I. *Spiroplasma* (3 especies)

Géneros afines: *Thermoplasma* y *Anaeroplasma* (particularmente en los rumiantes).

Cuadro 2. Micoplasmas aislados en el porcino

ENFERMEDAD	MICOPLASMA
Neumonía	<i>M. hyopneumoniae</i>
Artritis	<i>M. hyorhinis</i>
	<i>M. hyosynoviae</i>
	<i>M. flocculare</i>
Incierto	<i>M. suis</i>
	<i>A. axanthum</i>
	<i>A. granularum</i>

1.4.2.1 Características generales de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

La posibilidad de que un micoplasma estuviera involucrado en la Neumonía Enzootica fue investigada por dos grupos: Uno en Iowa, EE.UU. y otro en Cambridge, Inglaterra. Ambos reportaron en 1965 un micoplasma que producía neumonía típica en los cerdos, al cual los americanos llamaron *M. hyopneumoniae* y los ingleses *M. suis* posteriormente, mediante la prueba de inhibición metabólica, se demostró que eran serológicamente idénticos (Amanfu y col. 1984). El Comité de Nomenclatura de Micoplasmas dio prioridad al uso de *M. hyopneumoniae* (Livingstone y col. 1972).

El microorganismo se caracteriza por no pasar filtros de 0.22 micras y ser uno de los organismos más exigentes del género *Mycoplasma* (Livingstone y col. 1972). La observación con microscopía electrónica revela la presencia de pequeños filamentos en un medio que contiene suero equino, además de la presencia de una cápsula (Mendoza y col. 2001). Es un microorganismo de crecimiento lento, tarda de 7 a 10 días en crecer y su mayor crecimiento es en medios líquidos. En medios sólidos se desarrollan colonias de 0.5 mm de diámetro, caracterizándose por no presentar la protuberancia central típica que le da la apariencia de huevo estrellado, algunos autores la observan como "gotas de rocío" (Curtis, 1981, Curtis y col. 1975). Cuando se tiñe con Giemsa, se observan cocobacilos delgados de 0.1 a 0.2 micrómetros de diámetro, o como pequeñas ramificaciones de 0.1 a 0.2 micrómetros de grosor. En cultivos celulares crece formando grupos difusos como cocos de 0.5 µm de diámetro, en cadenas cortas o anillos de aproximadamente 3 µm de diámetro conteniendo una estructura parecida a un coco.

Este agente sólo afecta en forma natural al cerdo, el daño específico que origina es una disminución del número de cilios, y se debe a una citoxina. Los animales de experimentación como el hurón, embrión de pollo,

cobayo, mono rhesus, no han mostrado susceptibilidad al agente. No hemoliza los glóbulos rojos del cerdo, caballo, vaca o pollo (Livingstone y col. 1972).

1.4.2.2. Antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

El análisis antigénico de los micoplasmas es extremadamente difícil, debido al pequeño volumen de microorganismos que se obtiene (5-20 mg/litro de medio de cultivo). La antigenicidad se encuentra localizada en la membrana citoplasmática, especialmente en los polisacáridos que cuando se asocian a proteínas, son capaces de estimular la producción de anticuerpos. Los estudios sobre la naturaleza química de los micoplasmas han sido realizados por varios autores y los resultados encontrados revelan que existen antígenos proteicos, glicolípidos y polisacáridos (Bereiter y col. 1990).

Se han comparado algunas cepas de *M. hyopneumoniae*, encontrado una diversidad antigénica entre ellas, revelada por pruebas de inmunolectroforesis bidimensional. Los determinantes antigénicos son proteínas, glicolípidos y fosfolípidos que se localizan en la superficie celular. Las diferencias en la virulencia, inmunogenicidad y distribución geográfica no han sido determinadas (Kishima y Ross 1985).

También utilizando la técnica de inmunotransferencia con las siguientes cepas de micoplasmas porcinos: *M. hyopneumoniae* cepas J y 194, *M. flocculare*, cepa Ms 42 y *M. hyorhinis*, y los sueros de animales convalecientes de *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* y antisuero porcino de *M. flocculare*, se encontró que los anticuerpos detectaron cinco antígenos, estimando sus pesos moleculares en: 110, 50, 41, y 36 kDa. Hallaron también que existen reacciones cruzadas entre *M. hyopneumoniae* con *M. flocculare* y *M. hyorhinis*. Así los antígenos de 110, 50, 41 y 36 kDa de *M. hyopneumoniae*, cruzan serológicamente con *M. flocculare*. El antígeno de 36 kDa cruza con *M. hyorhinis*. El único antígeno de *M. hyopneumoniae*, que no cruzó con los otros micoplasmas mencionados fue el 64 kDa, el cual puede ser utilizado como antígeno específico para el diagnóstico de *M. hyopneumoniae* (Morrison y col. 1986).

En otro trabajo utilizando lavados bronquiales de cerdos inoculados con *M. hyopneumoniae*, cepa 232 y mediante la técnica de inmunotransferencia detectaron anticuerpos que reconocieron a diferentes antígenos cuyos pesos moleculares son: 200, 110, 97, 95, 80, 78, 74, 70, 60, 52, 50, 41, 36 kDa. Es de especial interés el antígeno de 97 kDa, ya que es el primero en detectarse a partir de los 35 días postinfección por anticuerpos IgA e IgG (Morrison y col. 1985).

Con inmunolectrotransferencia se han descrito cinco antígenos, denominados como P90, P68, P50, P30, P26. Existen evidencias de que

las proteínas P90, P68 y P50 tienen localización superficial (Geary y Walczak 1985).

Poco se sabe acerca de los componentes de la superficie de los micoplasmas que contribuyen a la interacción con las células del huésped. En el caso de *M. hyopneumoniae* una proteína, la P1, ha sido involucrada dentro del proceso de parasitismo a las células blanco, así como una adhesina de 160 - 190 kDa (Ciprián y col. 2001).

Un antígeno proteico de *M. hyorhinis* (P-120), se ha observado en la superficie del organismo durante la colonización de las células del huésped. Se han aislado e identificado un factor citopático de *M. hyopneumoniae* a partir de membranas de la cepa VPP 11. Éste factor es una proteína con un punto isoeléctrico de 6.2 con un peso de 54 kDa, capaz de inducir un efecto citopático en fibroblastos de pulmón humano (MRC-5) (Etheridge y Lloyd 1978).

1.4.2.3 Características Generales de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Cuando se desarrolla el micoplasma en medios sólidos se observan colonias pequeñas de 20 a 100 μm de diámetro a los 10 días, la colonia es característica y carece de pezón central. Los elementos individuales son muy pleomórficos, cuando crecen en medios sólidos, líquidos, cultivos celulares o cultivos "in vivo" (en lechones) pero en cada uno de estos sistemas de cultivo se desarrolla de manera característica: En las preparaciones de pulmón se observan formas de anillo y bipolares (0.5 a 0.8 μm de diámetro) que se puede encontrar aisladas o en grupos. En cultivos celulares crece en grupos difusos sobre todo como cocos (0.5 μm de diámetro) en cadenas cortas o anillos (aproximadamente 3 μm de diámetro) conteniendo una estructura parecida a un coco. En medios líquidos se observan formas filamentosas cocoides, filamentos ramificados finos (0.1 μm de diámetro) en estructuras globulares o colonias más confluentes, de mayor tamaño (aproximadamente 16 μm de diámetro) y abundantes (Goodwin y col. 1967 y Whittlestone 1979). Dependiendo del enriquecimiento del medio de cultivo, el micoplasma puede ser almacenado a -25°C en tejidos pulmonares neumónicos durante largos periodos de tiempo pero se inactiva rápidamente cuando se almacena a 4°C . No hemoliza los glóbulos rojos de cerdo, caballo, vaca o pollo. No se multiplica en embriones de pollo o produce lesiones cuando se inocula por vía pulmonar a ratones lactantes (Switzer 1967).

Comparando algunas cepas de *Mycoplasma hyopneumoniae* por métodos serológicos. Ro y Ross (1983) encontraron una diversidad antigénica entre ellas, revelada solamente por las pruebas de inmunoelectroforesis sin embargo la importancia de estas diferencias (distribución geográfica, virulencia o inmunogenicidad) no ha sido determinada.

1.4.2.3.1 Patogenia de la "Neumonía Enzoótica"

Ésta enfermedad se encuentra en las regiones de más alta producción en el mundo, casi todas las granjas están afectadas y la incidencia de las afecciones es sumamente alta; una variedad de reportes indican que los cerdos que salen al mercado, un 30 a un 75% está afectado (Armstrong 1982). Es habitual encontrar un porcentaje significativo de pulmones con lesiones típicas de "neumonía enzoótica", en los diferentes rastros; la incidencia encontrada varía del 12 al 81 % (Whittlestone 1979). En México, Maqueda (1977) hizo un análisis porcentual de la incidencia de "neumonía enzoótica" en cinco estados de la República, evaluando las lesiones macroscópicas de 4,013 pulmones correspondientes a igual número de cerdos. Los resultados mostraron que un 51% de los cerdos estaban afectados en mayor o menor grado, siendo la incidencia o severidad variables según los estados: Coahuila, 32.4% Guanajuato, 70.6%; Jalisco, 49.5%; Nuevo León, 23.5% y Sonora, 53.8%. En otro estudio realizado en rastros de la zona metropolitana de la Ciudad de México (Cuautitlán y Tlalnepanitla), se encontró el 23% de fluorescencia específica en pulmones neumónicos cuando se empleó la técnica de inmunofluorescencia indirecta (Ciprián y col. 1982).

La transmisión de las bacterias respiratorias se lleva a cabo fundamentalmente por contacto directo, por las secreciones nasales y faríngeas, por lo tanto el medio principal de diseminación es de cerdo a cerdo debido a que el micoplasma es muy frágil y no resiste mucho tiempo fuera del animal, así la transmisión del *M. hyopneumoniae* se lleva a cabo por contacto o por aerosoles entre cerdos infectados (fase aguda) o cerdos portadores convalecientes y los cerdos sanos (Friis 1973; Ross 1984 y Pijoan 1985).

La infección por el micoplasma es primero vertical (de madres jóvenes a lechones) y después al momento del destete, es horizontal (de lechones paridos por cerdas de primeros partos a lechones provenientes de cerdos de cuarto o quinto parto).

La transmisión horizontal se intensifica debido a la profunda tensión que acompaña al destete y se produce fundamentalmente al mezclar cerdos de diferentes camadas en una sola corraleta, lo que ocasiona peleas. Se ha encontrado que el constante mezclado de animales de todas las edades es uno de las principales causas de tensión en la pira (Pijoan 1985).

Estudios de otras enfermedades por micoplasma en otras especies sugieren que la susceptibilidad a estas enfermedades puede incrementarse con la edad. Sin embargo, en trabajos experimentales se encontró que no existe ninguna diferencia de susceptibilidad a la "neumonía enzoótica" en cuanto a la edad (Piffer y Ross 1984).

En condiciones experimentales, se ha reproducido la enfermedad: Hodges y col. (1969) utilizaron cerdos de granjas libres de "neumonía enzoótica" e infectaron a cerdos gnotobióticos con 2.5 a 5 ml (10 unidades cambiantes de color /ml) por vía intratraqueal y de 1 a 2 ml por vía intranasal y a cerdos SPF (libres de patógenos específicos) con 10 ml por vía intratraqueal y 5 ml por vía intranasal de la cepa J de *M. hyopneumoniae*, (altamente purificada) de dosis única y reprodujeron la neumonía. Confirmaron que *M. hyopneumoniae* es el agente primario en las neumonías del cerdo pero no excluyeron la posibilidad de que otros agentes puedan estar involucrados.

En otro estudio se utilizaron cerdos nacidos por cesárea y privados de calostro (CDCD) y fueron infectados por vía intranasal con suspensiones pulmonares de tejido neumónico de casos confirmados de "neumonía enzoótica"; aislaron el micoplasma en 15 de 16 cerdos inoculados y confirmaron la regularidad con la cual *M. hyopneumoniae*, puede reaislarse de casos activos de la enfermedad inducida experimentalmente (Goodwing 1972).

Por otro lado Underdahl y col. (1980) infectaron por vía intranasal cerdos gnotobióticos con 3 ml., de un cultivo diluido 1:1 con solución salina balanceada (el cultivo fue a partir de la cepa NB-12 de *M. hyopneumoniae* de 26 pases en cerdos CDCD Y 22 pases en medio líquido). Sólo realizaron el micoplasma en 10 de 16 cerdos inoculados y con mayor frecuencia cuando se cultivaron a partir del pulmón (área neumónica). También se emplearon cerdos provenientes de granjas libres de la enfermedad y se inocularon con homogeneizados de pulmonares (suspensión de pulmón neumónico al 10%) conteniendo la cepa 11 de *M. hyopneumoniae* por vía intratraqueal ("A") e intranasal ("B") el micoplasma se reaisló en 10 de 18 cerdos de grupo "A" y 9 de 12 del grupo "B" (Piffer y Ross 1984). Con el objeto de evaluar agentes quimioterapéuticos o de estudiar mejor a la neumonía enzoótica.

Hunnan y col. (1984) han desarrollado un modelo experimental, basado en la reproducción de la neumonía en cerdos gnotobióticos por medio de aerosoles, utilizando cultivos puros de *M. hyopneumoniae* de tercer pasaje cepa NB12, aislados de pulmón neumónico de lechones gnotobióticos. El periodo de incubación de la "neumonía enzoótica" de los cerdos en condiciones naturales varía entre 10 y 15 días (Ross 1984) o de 2 a 3 semanas (Goodwin y Whittlestone 1967, Livingston y col. 1972), sin embargo se han detectado variaciones extremas en donde la enfermedad se mantiene en forma subclínica hasta por 15 meses (Whittlestone 1979 y Ross 1984).

El micoplasma es depositado por inhalación en las márgenes centrales de los pulmones (observación dada por las lesiones que se producen) estableciéndose en el epitelio bronquial y bronquiolar, en donde la

población de éste microorganismo aumenta y avanza a lo largo del árbol respiratorio (Armstrong 1982). Esto se ha demostrado por microscopía electrónica de barrido e inmunofluorescencia, en donde se observó que el *M. hyopneumoniae*, se concentró en la superficie de las células epiteliales de los bronquios y bronquiolos sobre todo en los cilios, de donde probablemente parte hacia los alvéolos y es ingerido por los macrófagos alveolares. Los productos de degradación del micoplasma aparentemente estimulan a las células linfoides que se acumulan en estas áreas posiblemente la acumulación de células linfoides adyacentes a bronquios y bronquiolos representa una respuesta inmune hacia el micoplasma (Livingston y col. 1972).

En cultivo de órganos el *M. hyopneumoniae*, no tuvo preferencia para infectar a las células epiteliales de anillos traqueales o de pulmón (ambas fatales) y los resultados indicaron que un inóculo relativamente bajo de micoplasma libre de otros microorganismos, produjo daño local "in vitro", a tejidos del sistema respiratorio del cerdo.

El micoplasma probablemente induzca la pérdida de cilios debido a la elaboración de una o varias enzimas, de sustancias tóxicas; por parasitismo o por competencia de los materiales nutricionales, de tal manera que en las células epiteliales (pseudoestratificadas columnares) de la traquea y bronquios están afectadas, la secreción mucosa y los macrófagos alveolares se encuentran alterados y así la remoción de partículas y microorganismos patógenos y en éste caso micoplasmas no se lleva a cabo. Una vez que los cilios se pierden, el microorganismo colonizaría la partes fijas de las células respiratorias como resultado de la disminución del movimiento protector de la cubierta mucosa, (Williams y Gallagher 1978).

Cuando se ha establecido la infección sobre la superficie del epitelio, el micoplasma puede detectarse hasta las 15 semanas después de la inoculación. Estudios con inmunofluorescencia y cultivo indicaron que el número de micoplasmas disminuye en los estados tardíos de la enfermedad experimental y al parecer la intensidad de la infección y su duración fue variable (Livingston y col. 1972 y Undesdahl y col. 1980).

Geary y Walczak (1985) han aislado e identificado un factor citopático de *M. hyopneumoniae* a partir de membranas de la cepa VPP 11. Éste factor fue una proteína con un punto isoeléctrico de 6.2, un peso molecular de 54,000 daltones y fue capaz de inducir efecto citopático en fibroblastos de pulmón humano (MRC-5) a una concentración de 250 ng de proteína /ml. Es probable que éste factor tenga un papel importante en la patogénesis de la enfermedad natural en el cerdo.

Los mecanismos involucrados en el desarrollo de la respuesta linfohistiocítica peribronquial no están bien aclarados. Lesiones histopatológicas similares se han encontrado en neumonías por

micoplasmas en otras especies animales. La infiltración puede ser producida en respuesta a la persistencia de los micoplasmas en la superficie del conducto respiratorio ya que estos no penetran la mucosa.

Posiblemente algunos agentes mitógenos de los micoplasmas, sustancias bien conocidas que en pruebas de laboratorio estimulan inespecíficamente a los linfocitos, también estimulan la acumulación o proliferación de linfocitos en el huésped.

Por lo tanto no se sabe si la acumulación masiva de células inmunológicamente perjudiciales es también benéfica para la resolución de la enfermedad (Ross 1984), ya que en estudios microscópicos de las lesiones se encontró hiperplasia linforeticular perivascular, peribronquial y peribronquiolar en cerdos infectados experimentalmente con *M. hyopneumoniae* (Livingston y col. 1972 y Whittlestone 1973).

Desde el punto de vista histopatológico, Whittlestone (1972), reportó una serie de cambios en los pulmones de la siguiente manera:

- a) Etapas tempranas (7 a 28 días posinoculación), en la luz de los bronquios, bronquiolos y alvéolos se encontraron leucocitos polimorfonucleares (PMN) y pérdida de cilios, a medida que la lesión progresó, se incrementó el número de linfocitos en el tejido peribronquial, peribronquiolar y perivascular, en los alvéolos se encontró una mezcla de infiltrado celular y edema;
- b) En etapas de infección establecida (17 a 40 días de duración); hubo una extensiva proliferación de tejido linforeticular en áreas peribronquiales y perivasculares en la lamina propia se encontró penetración de linfocitos, una disminución de PMN y edema;
- c) En la etapa convaleciente (69 a 262 días) se encontró colapso alveolar, enfisema y un incremento de nódulos linfoides hiperplásicos alrededor de bronquios y bronquiolos.

Se presentaron más lesiones en los lóbulos apical y cardiaco, sin embargo se afectaron los lóbulos accesorio o intermedio en su parte ventral y los lóbulos caudales en las porciones cranovertrales, no importando si los animales son gnotobióticos, SPF o HPCD (Hodges y col. 1969; Etheridge y col. 1979 y Armstrong 1982).

El aspecto macroscópico de las lesiones dependerá del tipo de infección; cuando ésta se lleva a cabo en forma experimental en cerdos CDCD con cultivos puros de *M. hyopneumoniae*, con una cepa de bajo pasaje, se observó el área ligeramente inflamada, brillante, de distribución lobular y de color púrpura (Armstrong 1982); en cerdos gnotobióticos, SPF y obtenidos de granjas libres de "neumonía enzoótica" las lesiones encontradas fueron: áreas de consolidación de color gris-pálido, gris-rojizas o rojas (Hodges y col. 1969; Etheridge y col. 1979 y Piffer y Ross 1984). Al principio de la enfermedad, los lóbulos estaban ligeramente inflamados y brillantes y tenían una consistencia carnosa al corte y las vías respiratorias contenían un exudado blanco pegajoso y mucóide, (en

ésta fase primaria de la infección los pulmones son especímenes ideales para el aislamiento de *M. hyopneumoniae* debido a que se encuentra en grandes cantidades); posteriormente, las lesiones se redujeron y se comprimieron por debajo de la superficie del tejido pulmonar normal y su consistencia fue más fibrosa además de que estaban exentas de exudado (Armstrong 1982).

Armstrong (1982) menciona; "la enfermedad se caracteriza por muy baja mortalidad y alta morbilidad, donde el signo clínico más común es una tos crónica seca". Son también característicos el pelambre hirsuto, un pobre índice de crecimiento y una deficiente conversión de alimento. Estas últimas características hacen de la "neumonía enzoótica" una enfermedad importante económicamente que ésta directamente influenciada por enfermedades concurrentes tales como neumonías bacterianas. Al respecto Morrison y col. (1986), concluyen que los estudios sobre la asociación entre los parámetros de rendimiento (ganancia diaria de peso, GDP y conversión de alimento CA) y las lesiones en la "neumonía enzoótica", tienen diferentes resultados. El efecto que tienen las lesiones de la "neumonía enzoótica" sobre el rendimiento depende de las condiciones de manejo y del medio ambiente.

Generalmente los primeros signos clínicos en los casos agudos son anorexia, pirexia y respiración con soplo, en lugar de tos, la que se presenta después. Es importante tener en cuenta que toser (el signo más común) y neumonía son condiciones diferentes, la tos seca es más indicativa de bronquitis que de neumonía y en parte depende de la influencia de otros microorganismos, mientras que en cerdos infectados experimentalmente, a menudo tienen neumonía extensiva aunque no haya tosido anteriormente (Goodwin 1982).

La curación espontánea depende en su mayor parte de las condiciones ambientales, pero en condiciones de alojamiento superpoblado, las lesiones permanecen durante muchas semanas, en todo ese tiempo el micoplasma ésta presente en los cerdos y es propagado por ellos. Bajo condiciones de campo, en donde existe un grado variable de inmunidad pasiva, la neumonía tal vez no se presente inmediatamente después de la exposición a la infección, en algunos cerdos tal vez nunca se presente.

1.4.2.4 Inmunidad.

En las infecciones naturales por micoplasmas es notoria una marcada respuesta de inmunidad celular, a causa de la escasa antigenicidad de éste microorganismo y a la naturaleza crónica de la enfermedad. Se conocen hasta el momento una serie de eventos que a continuación se describen.

Existe primero una interacción entre *M. hyopneumoniae* y células del aparato retículo endotelial localizadas en pulmón, nódulos linfoides,

retrofaríngeos y bronquiales, encontrándose inmunoglobulinas en secreciones traqueobronquiales en una cantidad elevada a las dos semanas postinfección.

Posteriormente se han observado células con inmunoglobulinas específicas en su superficie contra *M. hyopneumoniae* en tejidos linfoides y pulmón a las 3 y 4 semanas posinfección. Un dato significativo es que la presencia de anticuerpos coincide con la aparición de las lesiones neumónicas (Lindqvist 1974).

En una infección con *M. hyopneumoniae*, se observa que la proporción de células que contienen IgA: IgG es de 1:3 en mucosa nasal y en ganglios retrofaríngeos, cambiando ésta proporción a 1:15 en nódulos linfoides bronquiales. En estos nódulos, a las tres semanas posinfección se encuentran todos los isotipos de inmunoglobulinas pero sobre todo la clase IgG que aparece desde la primer semana. Se han estudiado las secreciones traqueobronquiales utilizando la técnica de ELISA encontrándose que las inmunoglobulinas IgM e IgG, predominan en las primeras fases de la infección, mientras que las IgA van incrementándose progresivamente (Lindqvist 1974).

Los anticuerpos séricos tienen un comportamiento diferente al observado en las secreciones traqueobronquiales. Estos anticuerpos se detectan 5 semanas posinfección, siendo las IgG las más importantes detectadas por la técnica de ELISA (Livingstone y col. 1972). Las pruebas de ELISA y la fijación de complemento son las más utilizadas.

Actualmente se ha desarrollado la prueba de ELISA Tween 20 reduce al mínimo las reacciones cruzadas con *M. flocculare*, teniendo también ésta prueba amplias perspectivas para el monitoreo de datos, particularmente en la detección de anticuerpos del calostro de cerdas (Kobisch y col. 1990). Sin embargo, a pesar de que en estas pruebas se ha observado la aparición de altos niveles de anticuerpos, éstos no confieren protección (Goodwin 1972).

Con respecto a la inmunidad celular, ésta ha sido medida por las técnicas de transformación blastoide (Giger 1977; Klinkert y col. 1985 y Mendoza y col. 2001), hipersensibilidad cutánea (Adegboye 1998, Gabridge y col. 1982) encontrando una respuesta significativa a las dos pruebas hasta por un periodo comprendido de 44 a 66 semanas posinoculación, así mismo se ha detectado que existe una alteración de la función del macrófago alveolar e inmunosupresión en los cerdos infectados (Kishima y Ross. 1985). También se han detectado anticuerpos contra las glicoproteínas de membrana de los eritrocitos de cerdo después de una infección experimental con *M. hyopneumoniae*, apoyando de ésta forma la asociación de enfermedad autoinmune en la patogénesis de la NE (Lindqvist 1974).

Por otro lado se ha observado que los animales recuperados desarrollan una fuerte inmunidad a la enfermedad, ya que en la exposición experimental de cerdos, cuatro meses después de la primoinfección no desarrollan neumonía, en comparación con los cerdos que no tuvieron primoinfección. Sin embargo, ésta inmunidad es de corta duración ya que pueden desarrollar el proceso neumónico a los 11 meses después de una infección inducida (Goodwin 1972).

1.4.2.5 Diagnóstico de la Neumonía Enzoótica.

El diagnóstico de la neumonía enzoótica (NE), en la mayoría de los casos se realiza observando las lesiones macroscópicas e histopatológicas y aunque son características no son siempre específicas. En otras ocasiones, el diagnóstico se lleva a cabo en la granja en donde la piara presenta tos persistente, aunado a la presencia de cerca del 40% de lesiones macroscópicas cuando los cerdos llegan al rastro (Flesja y col. 1982).

Sin embargo, para un diagnóstico definitivo se tienen que combinar varios aspectos como son: Historia y signos clínicos, lesiones macroscópicas y microscópicas, identificación de *Mycoplasma hyopneumoniae*, por aislamiento o por técnicas inmunológicas y detección de anticuerpos contra éste micoplasma (Kobisch y col. 1987. Iglesias y col. 1982), así como con técnicas moleculares modernas como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

1.4.2.6 Historia y signos clínicos.

Se debe considerar que la NE es una enfermedad crónica que afecta a cerdos de 6 semanas o más y que la susceptibilidad no se ve afectada con la edad, con la alta morbilidad y baja mortalidad y con un período de incubación de 6 semanas (Friis 1969; Friis, 1971; Futo y col. 1995).

1.4.2.7 Lesiones macroscópicas y microscópicas.

Las lesiones macroscópicas en NE, consisten en áreas de consolidación púrpura-grisácea en las porciones craneoventrales de los pulmones. Se observan también lesiones avanzadas, una clara demarcación del tejido pulmonar normal del consolidado que aparece más "colapsado". Al corte tiene "consistencia de carne" pero no es tan firme y se encuentra un exudado catarral en los bronquios. Los nódulos linfáticos se encuentran aumentados de volumen (Ciprián 1988, Livingstone 1972).

Las lesiones microscópicas se encuentran en un hiperplasia linfocítica perivascular, peribronquial y peribronquiolar y macrófagos alveolares aumentados. Es importante señalar que las lesiones que se producen por

NE son características y consistentes y que pueden ser influenciadas por agentes secundarios (Armstrong 1982, Goodwin y Whittlestone 1973).

1.4.2.8 Aislamiento e Identificación de Micoplasmas.

En algunos laboratorios, el aislamiento de micoplasmas en un procedimiento de rutina que requiere aproximadamente de 2 a 6 semanas para hacerlo. Por un lado *M. hyopneumoniae* crece lentamente y es enmascarado por otros microorganismos de rápido crecimiento como *M. hyorhinis*. *M. hyopneumoniae* es uno de los microorganismos más delicados del género *Mycoplasma*.

Se han ideado una variedad de medios de cultivo para el aislamiento de *M. hyopneumoniae*, a pesar de eso, sólo son modificaciones del medio de Friis. (Curtis 1981, Curtis y col. 1975, Dayalu y col.1990). Dicho medio es relativamente económico y fácil de preparar además de ser confiable para su aislamiento, cuando se lleva a cabo de muestras de tejido neumónico, sin embargo, pocos investigadores han aprovechado tal descubrimiento, lo que explica que muy pocos laboratorios en el mundo sean capaces de aislar e identificar micoplasmas. En términos generales el aislamiento e identificación se realiza de la siguiente manera: a partir de tejido neumónico o lavados bronquiales se siembran en medio líquido de Friis, diluyendo la muestra decimalmente hasta 10^{-7} , se incuba a 37°C durante 5 o 7 días y después se hacen subcultivos de cada dilución en medio de Friis sólido y se incuba a 37°C durante 5 ó 7 días en una atmósfera de CO_2 al 5%, se observan las cajas y las colonias sospechosas, que carecen de "pezón central" y se lleva a cabo una serie de clonaciones en medios sólidos.

1.4.2.8.1 Pruebas bioquímicas en la caracterización de micoplasmas.

1.4.2.8.1.1 Prueba de dependencia de esteroides.

La prueba de dependencia de esteroides es un criterio que nos sirve para determinar a la familia que pertenecen los microorganismos, es decir si es dependiente de esteroides pertenecerá a la familia *Mycoplasmataceae* y será *Acholeplasmataceae* si no es dependiente de esteroides. Para la realización de ésta prueba se requieren discos de papel filtro impregnados con una solución de digitonina al 1.5%, posteriormente éste se coloca sobre los cultivos en medio sólido los cuales han sido sembrados con micoplasmas sospechosos. La formación de un halo alrededor del disco sin crecimiento indica dependencia (Debey y Ross 1994; Lara y col. 1985).

1.4.2.8.1.2 La prueba de fermentación de los carbohidratos.

La prueba de fermentación de los carbohidratos nos sirve para determinar la capacidad de degradar un determinado carbohidrato en un medio líquido de cultivo. Entre los carbohidratos más utilizados están: glucosa, fructosa, manosa, inositol y dulcitol. Un cambio del color amarillo del medio nos indica una reacción positiva (Artiushin 1993; Lara 1985).

1.4.2.8.1.3 Prueba de reducción del tetrazolio.

Ésta prueba nos sirve para determinar si el micoplasma es fermentativo o no, por la capacidad de reducir el colorante tetrazolio (cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio). Si hay formación de una mancha rosada en el agar que contiene tetrazolio a una concentración de 0.03%, será positivo, si no hay cambio de color será negativa. (Burch 1982).

1.4.2.8.1.4 Prueba de hidrólisis de la arginina.

Ésta prueba nos mide la capacidad de descarboxilar el aminoácido L-arginina. Los micoplasmas aislados se siembran en el medio de arginina líquida y se incuba. Una reacción color púrpura se da como positiva.

1.4.2.8.1.5 Prueba de hidrólisis de la urea.

Ésta prueba nos sirve para detectar la capacidad de desdoblar a la urea en amoníaco. Se incuban los micoplasmas en medio líquido con urea, una reacción positiva nos dará una coloración púrpura.

1.4.2.8.1.6 Prueba de producción de peróxido de hidrógeno.

Ésta prueba nos sirve para determinar si éste agente es capaz de producir peróxido de hidrógeno "*in vitro*" en medios de cultivo sólido. En la prueba se utilizan eritrocitos tipo O de humano y la presencia de la producción del peróxido se detecta por medio del daño que les causa. Los glóbulos rojos son mezclados con azul de metileno. Una reacción positiva se manifiesta cuando se tiñen los eritrocitos de color azul que rodean a las colonias de micoplasmas (Boughton y Thorns 1976; Brooks y Faulds 1989; Hannan 1984 y Lindqvist 1974).

1.4.2.8.1.7 Pruebas serológicas en la identificación de los micoplasmas.

Se han desarrollado una serie de pruebas serológicas con la finalidad de identificar a las diferentes especies de micoplasma como son: La prueba de inhibición metabólica, de inhibición de crecimiento y la de epinmunofluorescencia. Las dos primeras son muy similares ya que son pruebas de neutralización, la cual se lleva a cabo por medio de un antisuero homólogo, el que ejerce una actividad inhibitoria. La diferencia

básica es que la prueba de inhibición metabólica se realiza en medio líquido y la prueba de inhibición de crecimiento se realiza en medio sólido. La prueba de epinmuno fluorescencia, es una variante de la prueba de inmunofluorescencia, utilizando también un suero específico, ésta prueba se realiza directamente sobre las colonias del micoplasma en un medio sólido, La observación de colonias fluorescentes indica una reacción positiva (Dee 1996; Dee y Philips 1997).

1.4.2.8.2 Detección de *M. hyopneumoniae*, en tejido pulmonar.

A partir de tejido pulmonar neumónico se puede detectar el micoplasma empleando anticuerpos fluorescentes a partir de cortes transversales de las vías respiratorias, donde se observan partículas típicas verde brillante que se localizan en el epitelio ciliado de bronquios y bronquiolos (Feld 1992; Giger y col. 1977; Hannan y col. 1984). En estudio realizado en los rastros de la zona metropolitana de la Ciudad de México, se encontró recientemente una positividad por ésta prueba del 23% en pulmones de los rastros cercanos a la ciudad de México. (Bommeli y Nicolet 1993, Calsamiglia 1999). Recientemente han desarrollado técnicas más avanzadas para la detección del micoplasma en los pulmones porcinos tales como las pruebas de ELISA de captura y las pruebas de diagnóstico molecular.

La prueba de ELISA captura se realiza con la proteína 74 kDa de *M. hyopneumoniae*. Éste procedimiento ha mostrado ser más específico que la prueba de inmunofluorescencia en la detección en muestras clínicas. También se han desarrollado moléculas de DNA recombinante con secuencias específicas del genoma de *M. hyopneumoniae* para utilizarse en las pruebas serológicas (Drummond y col. 1980; Etheridge y Lloyd 1979).

1.4.2.8.3 Inmunodiagnóstico.

Se han empleado varias pruebas serológicas para el diagnóstico de la NE en cerdos vivos: Fijación de complemento (FC), Hemoaglutinación indirecta, Aglutinación en tubo, Aglutinación rápida en placa, Aglutinación en látex, ELISA, y ELISA Tween 20.

Se han comparado la prueba de FC y ELISA para detectar anticuerpos en las infecciones tempranas de *M. hyopneumoniae* mediante un análisis estadístico discriminante y se encontró que la primera detección de anticuerpos FC, fue a la 3a. y 5a. semana y que la primera detección de anticuerpos ELISA fue a la segunda semana. Éste trabajo demuestra que la prueba de ELISA, es altamente sensible.

1.4.2.9 Control de la Neumonía Enzoótica mediante la vacunación.

La vacunación ha mostrado inducir protección en otros modelos experimentales de micoplasmosis respiratoria, así tenemos *M. pneumoniae* en hámsteres, *M. pulmonis* en ratón y ratas, *M. bovis* en bovinos y *M. gallisepticum* en pollos. Los inmunógenos preparados han reducido la colonización en el pulmón de estas especies (Kobisch y col. 1987). La vacunación contra *M. hyopneumoniae* se ha intentado por varios investigadores, pero con resultados poco alentadores pues no confiere una protección duradera, debido primordialmente a la naturaleza del micoplasma que es antigénicamente muy pobre (Caron y col. 2000, Debey y Ross 1994). Otro factor que se ha mencionado en el fracaso de la vacunación es que la membrana del micoplasma es muy parecida a las membranas de los mamíferos, lo cual, la hace poco antigénica por no ser "extraña" (Hsu y Minion 1998). Se consideraba que el fracaso en la elaboración de vacunas para afecciones causadas por micoplasmas porcinos radica en la dificultad de la producción de antígeno y de encontrar un adyuvante eficaz. Sin embargo al parecer ésta dificultad ha sido mejorada con la producción de las bacterinas por laboratorios comerciales, dado que estos han encontrado la forma de producir masivamente el micoplasma, mediante la utilización de cepas de micoplasmas de alta reproducción y la optimización de los medios de cultivo, haciendo de ésta manera económicamente rentable la venta de la bacterina (Bommeli y Nicolet 1983; Caron y col. 2000; Goodwin y Whittlestone 1973; Minion y col. 2000). Actualmente los inmunógenos para la prevención de la Neumonía Enzoótica se clasifican en: Inmunógenos convencionales, Inmunógenos de extractos de membrana e Inmunógenos de subunidades.

1.4.2.9.1 Inmunógenos convencionales.

Los primeros trabajos realizados para buscar una bacterina eficiente por Goodwin fueron con *M. hyopneumoniae* inactivado con formol. Se encontraron que la inmunización de los cerdos por vía subcutánea no produjo ningún efecto considerable con relación al crecimiento de los animales, o bien respecto a la frecuencia o intensidad con la que se presentó la neumonía; por el contrario, el uso de otra bacterina por vía intramuscular, similar a la anterior pero con una cantidad de *M. hyopneumoniae*, más concentrada, tuvo la limitante de que se produjeron reacciones locales muy severas debidas al adyuvante. Las bacterinas formolizadas no confirieron inmunidad significativa, aun cuando se lograron títulos elevados de anticuerpos (Friis 1973). Posteriormente usando cinco bacterinas con diferentes tratamientos de inactivación, fueron efectivas al inocular a 56 cerdos con cualquiera de las cuatro preparaciones denominadas: A, B, F, G, únicamente trece cerdos (23.2%) presentaron lesiones neumónicas, después del desafío intranasal con

cultivos del micoplasma y en el grupo control que constó de 54 cerdos, 45 de ellos presentaron lesiones neumónicas (83.3%).

Estos datos indicaron que estas bacterias podrían ser usadas en la prevención de la micoplasmosis pulmonar porcina. Sin embargo el aislamiento del micoplasma de los grupos inmunizados estableció que una verdadera vacuna debería de prevenir la colonización del micoplasma en el pulmón. Otro aspecto que se observó es que el encontrar niveles altos de anticuerpos medios por la prueba de hemoaglutinación indirecta, no era sinónimo de protección (Goodwin 1972). Se tienen datos de una bacterina elaborada y vendida en Suiza por los laboratorios Pfizer que fue usada para la prevención de la Neumonía Enzoótica. Dicha bacterina contenía *Mycoplasma hyorhinis* formolizado adicionada con hidróxido de aluminio como adyuvante. De acuerdo a la información obtenida se vendieron 10,000 dosis entre los años de 1962 y 1968. Sin embargo no se conoce la razón del uso *Mycoplasma hyorhinis*, que siendo serológicamente distinto de *M. hyopneumoniae*, se haya usado para la prevención de la micoplasmosis pulmonar porcina (Goodwin 1972).

En 1976 se reportó una vacuna oleosa que proporcionó una protección del 75% (Frey 1994). Se ha experimentado con una bacterina con *M. hyopneumoniae* inactivada en adyuvante complemento de Freund, que fue probada en lechones a los cuales se les determinó la respuesta inmune celular - humoral y el efecto protector de la inmunidad producida. La respuesta inmune celular fue medida por transformación blastoide y la humoral por la prueba de ELISA. Después de la vacunación los animales mostraron una marcada sensibilización de los linfocitos y un alto título de anticuerpos, sin embargo cuando los animales fueron desafiados por una infección natural (fueron puestos en contacto con animales que presentaban signos de neumonía enzoótica), no se observó un efecto protector de la inmunización, ya que los resultados histopatológicos, bacteriológicos y de inmunofluorescencia entre los grupos no vacunado y vacunado no mostraron diferencias (Goodwin 1971).

Etheridge Lloyd, en 1982 reporta que al utilizar una vacuna viva por vías intravenosa, subcutánea e intraperitoneal, *M. hyopneumoniae* fue aislado en menor frecuencia de los cerdos inmunizados, sin embargo causaba artritis en los animales (Kristensen y col. 1981). Se ha reportado que el dextran sulfato (DS) aumenta la reacción de hipersensibilidad retardada para *M. pulmonis* en el ratón, por lo cual se evaluó el efecto de ésta sustancia con células muertas de *M. hyopneumoniae* sobre la respuesta inmune celular y humoral. La respuesta celular fue determinada por la prueba de transformación blastoide y la respuesta humoral por la prueba de fijación de complemento. Tanto la respuesta celular como la humoral con *M. hyopneumoniae* con DS fueron superiores al grupo que solo recibió el micoplasma y con el que no fue inmunizado la media de los porcentajes de lesión neumónica entre los grupos de *M. hyopneumoniae*

más DS, el de micoplasma solo y el sin vacuna fue de 1.21, 4.02 y 8.47% respectivamente. Por lo que en éste trabajo, la severidad de la neumonía utilizando al DS como adyuvante fue significativamente menor que con el grupo no vacunado (Giger 1977).

En uno de los trabajos más completos, sobre inmunógenos, se prepararon varias vacunas utilizando células completas del micoplasma, extractos de células, sobrenadante de cultivo y células lavadas con solución salina. Los resultados obtenidos de la bacteriana con células completas mostró que la concentración de 10^9 unidades cambiantes de color (CCU) fue la que dió mejor protección, mostrando con esto que no se requiere de un cultivo concentrado para la producción del inmunógeno. De los sobrenadantes obtenidos por lavado de solución salina del micoplasma se observó que éstos tenían actividad protectora. Ross sugiere que esto se debió probablemente a que durante el proceso de centrifugación no se removió toda la membrana del micoplasma, probablemente contribuyendo esto a inducir protección. Las células tratadas con calor también mostraron actividad protectora, manteniéndose ésta hasta los 80° C. Los extractos no tuvieron ningún efecto protector, incluso dichos extractos incrementaron el desarrollo de lesiones (Kristensen 1981).

Ross y su grupo, utilizaron dos vacunas denominadas XMHP4 - 1 y XMHP5, ambas contienen células completas e inactivadas *M. hyopneumoniae* con un adyuvante no mencionado, difiriendo las dos por el tipo de agente inactivante utilizado. Estas dos vacunas fueron evaluadas primero en cerdos libres de enfermedades respiratorias. De las dos vacunas la denominada XMHP5 fue la que produjo una relativa protección contra la exposición intratraqueal de homogenizado pulmonar del micoplasma, ya que ésta vacuna produjo reducción en el porcentaje de lesión, pulmonar, de lesión microscópica y del número de cerdos positivos a inmunofluorescencia. Al realizar una prueba con cerdos convencionales utilizando ésta vacuna y con un desafío con dos tipos de cepas de *M. hyopneumoniae* se observó que el grupo control mostró una medida de lesión pulmonar del 41.15% y el grupo vacunado solo el 6.8%. Confirmándose con estos datos la eficacia de ésta vacuna (Caron y col. 2000).

Los laboratorios Fort Dodge han elaborado una bacterina con la cepa *M. hyopneumoniae* denominada cepa Solvay 1002, la bacterina ésta formada por células completas de *M. hyopneumoniae* inactivadas mediante un "procedimiento especial". Al comparar la eficacia de ésta bacterina con una formolizada, en animales de granjas del estado de Iowa con *M. hyopneumoniae* confirmado, se observó que animales vacunados con la bacterina formolizada, y otros con la bacterina de éste laboratorio, los cerdos del grupo control presentaron un porcentaje de lesión pulmonar de 26.4, 11.6 y 30.4% respectivamente. En otras pruebas de campo realizadas se ha observado reducciones de lesión pulmonar del 60 y 67%.

1.4.2.9.2 Inmunógenos de extractos de membrana.

El uso de membranas de *M. hyopneumoniae* como inmunógenos ha sido utilizado vacunando cerdas para que éstas a través de calostro transfieran anticuerpos protectores a los lechones. Los resultados muestran que de ésta manera los animales se protegieron pasivamente contra la infección experimental del micoplasma. En otro trabajo en cooperación con los laboratorios Rhone Merieux, se encontraron evidencias que la misma vacuna puede inducir inmunidad activa cuando se administra en lechones (Kobisch 1990).

1.4.2.9.3 Inmunógenos de subunidades.

El uso de antígenos basándose en subunidades para el desarrollo de vacunas ha sido contemplado por varios grupos. Una proteína específica de 64 kDa, la cual aparentemente tiene una función de adhesión, ha sido utilizada como inmunógeno, sin embargo en un estudio piloto no indujo protección en cerdos. Trabajos realizados en los laboratorios Lilly Sinergen usando vacunas preparadas con la proteína de 85 kDa obtenida de cepas nativas o por ingeniería genética, han demostrado que protege significativamente contra la neumonía experimental. Otros candidatos proteicos para estudio como posibles inmunógenos serán las proteínas de 36 kDa y de 74.5 kDa (Kobisch 1990).

1.5 *Mycoplasma hyorhinis*.

La infección respiratoria con *Mycoplasma hyorhinis* ha sido reportada en los cerdos en diferentes países. Normalmente es el primer micoplasma que se aísla de los tejidos porcinos cuando se intenta aislar micoplasmas. Es un contaminante común de las líneas celulares.

1.5.1 Epidemiología.

Las infecciones por *M. hyorhinis*, son transmitidas de hembras infectadas a los lechones o por parte de lechones de edad más avanzada a más jóvenes, ya sea en las maternidades, destetes o en las engordas. El microorganismo puede ser aislado de la cavidad nasal y de las secreciones de los cornetes nasales en un 10% de las hembras (Ross and Spear 1973) y en un 30 a 40% de la cavidad nasal de los lechones al destete. El organismo es común en los pulmones con lesiones neumónicas encontrados en el rastro. Las infecciones nasales y traqueobronquiales con *Mycoplasma hyorhinis* se diseminan rápidamente una vez que un cerdo se ha infectado. Muchos cerdos infectados no denotaran enfermedad clínica, sin embargo trabajos realizados por Kott en 1983, en cerdos gnotobióticos sugieren un papel muy importante de la bacteria en las neumonías de los lechones antes del destete.

1.5.2 Patogénesis.

Mycoplasma hyorhinis es muy común en las secreciones nasales y traqueobronquiales de los cerdos jóvenes. Es como en otras enfermedades donde el estrés y la neumonía facilitan la septicemia en los cerdos que han sido colonizados por ésta bacteria. Cuando esto ocurre el microorganismo puede ubicarse en articulaciones y en membranas serosas y cavidades, donde puede provocar una inflamación serofibrinosa aguda. *Mycoplasma hyorhinis* puede ser aislado en etapas agudas de lesiones de poliserositis y artritis. Durante la fase subaguda de la enfermedad (de 2 semanas a 3 meses) puede ser aislado, pero su presencia irá decayendo de manera progresiva en los diferentes órganos afectados. El microorganismo puede permanecer hasta por 6 meses en algunas articulaciones afectadas. Algunas cepas del microorganismo producen neumonía en cerdos gnotobióticos (Gois y Kuksa 1974). Es menos claro si es posible que actúe como patógeno pulmonar primario en cerdos convencionales. Es posible que exista una patogenicidad dependiente de cepa o aislamiento para *Mycoplasma hyorhinis*. Aún así, *Mycoplasma hyorhinis* es un aislamiento frecuente de las neumonías con hiperplasia linforeticular, las cuales son características de *Mycoplasma hyopneumoniae*, y de otras bronconeumonías. No se ha detectado una diferencia en grado de severidad en neumonías con o sin la presencia de *Mycoplasma hyorhinis*.

1.5.3 Signos clínicos.

Los brotes de poliserositis generalmente ocurren en cerdos de entre 3 y 10 semanas de edad, ocasionalmente la enfermedad puede ocurrir en animales adultos jóvenes. La primera evidencia clínica de la enfermedad se encuentra de 3 a 10 días posteriores a la exposición o a un fenómeno de estrés (Friis 1976). Los signos de la fase aguda van desde pelo hirsuto, presentación de fiebre ligera, desplazamiento limitado o reducido por dolor, inapetencia moderada, respiración difícil, postración abdominal e inflamación de las articulaciones. La duración y el grado de los cambios clínicos durante la fase aguda varían, dependiendo de la severidad de las lesiones. Los signos de la fase aguda desaparecen en 10 a 14 días y los signos clínicos más importantes son el dolor y la inflamación articular. El involucramiento de las articulaciones es más fuerte en las fases subagudas de la enfermedad (Friis y col. 1990). El dolor y la inflamación articular se hace menos severo paulatinamente y puede durar hasta por 2 a 3 meses y en algunos casos hasta por 6 meses, posteriores al brote.

1.5.4 Lesiones.

Las lesiones de la fase aguda consisten en una pericarditis, pleuritis o peritonitis fibrinopurulenta. Las lesiones en las articulaciones generalmente son características de la inflamación y las membranas

sinoviales se ven afectadas presentándose una sinovitis con líquido sinovial serosanguinolento en algunos casos. La fase subaguda genera adherencias y un estrechamiento de los espacios sinoviales y de las serosas. Las membranas sinoviales pueden estar más delgadas de lo normal y la hipertrofia de las vellosidades de las membranas sinoviales es evidente. El incremento en el fluido sinovial de tipo serosanguinolento es algo frecuente. En edades entre 3 a 6 meses, las lesiones aparecen de manera menos activa, pero se puede producir una erosión en el cartílago y observarse panus. Las lesiones en la serosa consisten en adherencias y fibrosis (Morita y col. 1995).

Trabajos japoneses han demostrado que la infección con *Mycoplasma hyorhinis* es muy común en el tubo de Eustaquio de cerdos jóvenes. Morita y col. (1995) estudiaron la patología de las orejas de 479 cerdos de entre 1 día de edad y 1 año. Histológicamente encontraron evidencia de otitis en un 76% de los cerdos. Inmunohistoquímicamente se encontró a *Mycoplasma hyorhinis* en el epitelio de los tubos de Eustaquio en 14 de los 28 cerdos evaluados. Todos los cerdos con ésta infección presentaron una inflamación del conducto severa. La demostración de los *Micoplasmas* en los cilios de los conductos fue mediante la microscopía electrónica. Los autores sugieren que la otitis media de los cerdos puede ser causada primariamente por *Mycoplasma hyorhinis*. Adicionalmente las infecciones de los conductos de Eustaquio se han asociado junto con conjuntivitis en los cerdos (Friis 1976).

1.5.5 Diagnóstico.

Las lesiones macroscópicas tipo poliserositis serofibrinosas a fibrinopurulentas con artritis en cerdos de 3 a 10 semanas de edad son sugestivas de *Mycoplasma hyorhinis*, recordando que también *Haemophilus parasuis* y otros agentes producen lesiones similares (Ross y col. 1996). El microorganismo normalmente puede ser aislado de lesiones que se encuentren en la fase aguda o subaguda de la enfermedad. Los animales que se utilicen para fines de diagnóstico deben de ser sacrificados en la etapa aguda de la enfermedad (Ross y col. 1983). Los cambios postmortem incluyendo la autólisis, reducen la posibilidad de aislar al *Mycoplasma hyorhinis*, por lo que se deben de utilizar animales vivos para éste proceso.

1.5.6 Tratamiento.

Aún y cuando *Mycoplasma hyorhinis* es normalmente sensible a la tilosina y a la lincomicina *in vitro*, la terapia clínica en cerdos afectados por ésta bacteria no es muy satisfactoria. La respuesta inflamatoria parece prevenir la penetración de la mayoría de los antibióticos y de ésta manera se perpetua la infección. Los tratamientos con tilosina o con lincomicina

en premezcla para aplicación de toda la población en edad de riesgo pueden ser benéficos (Johnson y col. 1978).

1.5.7

Prevención.

Los programas de control deben de ser enfáticos en el control de enfermedades respiratorias, entéricas o factores de estrés que pueden predisponer la enfermedad causada por *Mycoplasma hyorhinis* (Gois y col. 1974). No existe información acerca de la eficacia de la medicación profiláctica con tilosina, lincomicina u otros antibióticos.

2.- OBJETIVOS.

2.1 Objetivo general.

Desarrollar un modelo experimental para reproducir la enfermedad de Glässer y poder evaluar pruebas diagnósticas e inmunógenos.

2.2 Objetivos Particulares.

- 2.2.1 Desarrollar la técnica bacteriológica para el cultivo e identificación del *Haemophilus parasuis*.
- 2.2.2 Evaluar un modelo experimental para el estudio de la patogénesis de *Haemophilus parasuis* y posibles interacciones con *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Mycoplasma hyorhinis*.
 - 2.2.2.1 Evaluar los signos clínicos, en los diferentes grupos experimentales.
 - 2.2.2.2 Evaluar las lesiones macroscópicas así como las microscópicas de los diferentes grupos de trabajo.
 - 2.2.2.3 Realizar la recuperación de *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Mycoplasma hyorhinis* de los diferentes grupos desafiados.
 - 2.2.2.4 Realizar la serología pertinente a los grupos para determinar su estado inmunológico.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Colección de muestras de diferentes granjas

Se utilizaron diferentes muestras clínicas referidas al laboratorio de Microbiología de las Enfermedades Respiratorias del Cerdo de la Facultad de Estudios superiores Cuautitlán, UNAM, como fueron: líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, líquido pericárdico, líquido ascítico, corazón y pulmones de 18 animales de entre 3 semanas a 12 semanas de edad, procedentes de varias granjas de las regiones porcícolas del país. Todos los animales presentaron problemas respiratorios y/o nerviosos. Las lesiones encontradas fueron de una amplia gama en estos animales, en general presentaban los pulmones abscesos multifocales, hidrotórax, hidropericardio, adherencias pleurales, ascitis, peritonitis y congestión en meninges.

Cuadro 1. Cantidad de muestras biológicas colectadas de diferentes granjas.

Muestra	Número
Líquido pericárdico	14
Líquido sinovial	16
Líquido cefalorraquídeo	13
Líquido ascítico	14
Líquido de hidrotórax	12
Pulmones	18
Corazones	16

3.2 Aislamiento e identificación de *Haemophilus parasuis*

Todas las muestras se sembraron en agar PPLO con 5% de sangre de bovino; agar PPLO, sin sangre y se le colocó una estría de una cepa de *Staphylococcus aureus*, además se sembraron en McConkey y se incubaron a 37° C en velobiosis durante 24 a 48 horas. Las colonias que presentaron dependencia al factor V (NAD) fueron reaisladas y purificadas en agar PPLO, con la cepa nodriza. A las colonias sospechosas se les realizó la tinción de Gram y se sembraron en una serie de pruebas bioquímicas: indol, urea, determinación del fenómeno de CAMP, catalasa, oxidasa, nitratos, nitritos, ácido sulfhídrico, arabinosa y ribosa (Møller y col., 1990). La identificación final se realizó con el antisuero de *H. parasuis*, serotipo 5 mediante la prueba de aglutinación en placa.

3.3 Preparación de los inóculos con las cepas de trabajo.

- 3.3.1 Se cultivó la cepa ATCC 19417 de *Haemophilus parasuis* serotipo 5 en agar PPLO, adicionado de extracto fresco de levadura (10%), se cosecho la biomasa y se ajustó por nefelometría a 1.5×10^8 bacterias / ml para preparar el inóculo necesario para la infección.

3.3.2 Se cultivó la cepa ATCC 25934 de *Mycoplasma hyopneumoniae* en medio de Friis y se ajustó a 1×10^4 UCC, la biomasa se inoculó intratraquealmente a un lechón de 21 días, el cual se sacrificó al presentar signos respiratorios clásicos de Neumonía Enzoótica, se retiró el pulmón asépticamente y se realizó un homogeneizado pulmonar, el cual fue inoculado nuevamente a otro lechón, llevándose a cabo el proceso anterior y el homogeneizado pulmonar obtenido se congeló a -70° C hasta el momento de su empleo.

3.3.3 También se cultivó la cepa ATCC 17981 de *Mycoplasma hyorhinis* en medio de Friis y se ajustó por colorimetría a 1×10^4 UCC / ml y se congeló a -70° C hasta el momento de su uso.

3.4 Diseño Experimental.

3.4.1 Instalaciones.

Los animales fueron colocados en unidades independientes de acuerdo al diseño experimental efectuado. Los animales fueron alimentados con concentrado de Purina sin antibióticos, durante toda el desarrollo del experimento.

3.4.2 Animales.

Se utilizaron 32 cerdos destetados a los 21 días, procedentes de una granja seronegativa a PRRSv, VEA, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, evaluados por la pruebas de ELISA comerciales, *Haemophilus parasuis* con una prueba de aglutinación y Enfermedad del Paramyxovirus porcino por la prueba de HI.

Se formaron 8 grupos de 4 lechones cada uno. Los Grupos 1, 4, 5 y 6 se desafiaron con *Mycoplasma hyopneumoniae* por vía intratraqueal. Los grupos 2, 4, 5 y 7 se desafiaron por esa misma vía con *Mycoplasma hyorhinis*. Cuando los Grupos 1, 4, 5, 6 y 7 inoculados con los micoplasmas presentaron el pico febril característico de la enfermedad, así como los Grupos 3 y 8, se desafiaron con *Haemophilus parasuis* por aerosolización. El diseño experimental se puede observar en el cuadro 2.

3.5 Cámara de Nebulización.

Se utilizó una cámara de nebulización construida según Sebuya y col. (1983). A una presión de $2 \text{ Kg} / \text{cm}^2$ para obtener las partículas del tamaño deseado, en donde los grupos correspondientes fueron nebulizados durante 30 minutos con el inóculo correspondiente o con Solución Salina Fisiológica Estéril (SSFE). Según fue el caso.

3.6 Toma de muestras y constantes fisiológicas.

Se realizaron muestreos cada 7 días, durante el experimento, para llevar a acabo los estudios serológicos, además de que se tomo la temperatura rectal diariamente. Así mismo, la observación de la signología clínica diariamente.

El sacrificio de los animales se efectuó cuando el último de los cerdos del grupo con triple desafío presentó los signos clínicos graves en un periodo de 10 días posdesafío.

Cuadro 2. Diseño experimental efectuado con ocho grupos de cuatro cerdos cada uno.

GRUPO	TRATAMIENTO (inóculos)	VIA	DIA	DOSIS
1	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	IT	1	10 ml / cerdo.
2	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	IT	11	10ml. /cerdo/ 10^4 UCC.
3	<i>Haemophilus parasuis</i>	NEB	16	27ml. /grupo/ 1.5×10^8 bacterias /ml.
4	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> <i>Mycoplasma hyorhinis.</i>	- IT	1-11	10 ml. cerdo/27ml./grupo 1.5×10^8 bacterias /ml.
5	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> <i>Mycoplasma hyorhinis.</i> <i>Haemophilus parasuis.</i>	- - IT-IT-NEB	1-11-16	10 ml cerdo /10 ml cerdo 10^4 UCC/ 27ml. /grupo/ 1.5×10^8 bacterias /ml.
6	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> <i>Haemophilus parasuis</i>	- IT-NEB	1-16	10ml. cerdo/27ml/ grupo/ 1.5×10^8 bacterias /ml.
7	<i>Mycoplasma hyorhinis</i> <i>Haemophilus parasuis</i>	- IT-NEB	11-16	10 ml cerdo/ 10^4 UCC/27ml/ grupo/ 1.5×10^8 bacterias /ml.
8	CONTROL NEGATIVO	IT-IT-NEB	1-11-16	SSFE.

IT: intratraqueal, NEB: nebulización

3.7 Necropsia y evaluación de las lesiones macroscópicas.

El sacrificio se realizó mediante la sedación con 2 mg Azaperona (Sural: Chinoín, Productos Farmacéuticos, S.A. de C. V., México) por Kg de peso vivo, y anestesiados profundamente con 0.3 mg Etomidato (Hypnomidate: Janssen-Cilag, S.A. de C. V., México) por Kg de peso vivo, con la posterior exsanguinación en blanco. Posteriormente se realizó la necropsia y se procedió a tomar muestras, para realizar diferentes estudios: aislamiento, inmunofluorescencia directa (IFD), histopatología, serología y planimetría de los pulmones (Ciprián y col. 1988).

3.8 Reaislamiento de los agentes inoculados.

Los aislamientos se llevaron a cabo de la siguiente manera: para *Haemophilus parasuis*: de pulmón, corazón y líquido sinovial y para *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Mycoplasma hyorhinis* sólo se utilizó el pulmón.

3.9 Histopatología.

Los tejidos se fijaron en paraformaldehído, se deshidrataron en diferentes alcoholes, se cortaron las muestras para su inclusión, se incluyeron en parafina, se realizaron cortes de 4 a 6 μm , se fijaron a los portaobjetos, se desparafinaron y se realizó la tinción de Hematoxilina-Eosina (HE), se les colocó el cubre objetos con resina.

3.10 Serología.

De los sueros obtenidos de los animales se realizaron varias técnicas para evaluar la respuesta serológica: Para *Actinobacillus pleuropneumoniae* (ser. 1, 3, 5 y 7) se realizó la técnica de Neumotest[®] (Ciprián y Mendoza 1998). La prueba de ELISA para el Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS) (IDEXX, USA.), y para *Mycoplasma hyopneumoniae* (ELISA), y una IFD para *Haemophilus parasuis*.

3.11 Parámetros productivos de ganancia de peso.

A todos los animales de los grupos se pesaron diariamente para llevar a cabo dos mediciones ganancia diaria de peso, la que se realizó con la fórmula: GP = ganancia / tiempo y la conversión alimenticia con la fórmula: CA = Kg alimento / ganancia.

3.12 Medios de cultivo para micoplasma, todos los medios y soluciones empleados están referidos en el Manual de Técnicas y procedimientos. Laboratorio de Microbiología de las enfermedades respiratorias de los cerdos, FES Cuautitlán - UNAM.

3.12.1 Medios líquidos para aislamiento.

El medio líquido que se empleó fue el de Friis, que se preparó a partir de medios basales comerciales: caldo PPLO (Difco) y caldo BHI (Difco). Se esterilizó en autoclave a 121° C y 15 libras de presión durante 15 minutos y se mantuvo a una temperatura de 45 a 50° C en baño María. Después se le adicionó en forma aséptica, suero estéril de caballo (colectado en rastro, clarificado mediante la filtración con cartuchos Millipore "Lifeguard" CP-15 y esterilizado por filtración con membranas Millipore de 0.22 μm), extracto de levadura estéril e inhibidores.

3.12.1.1 Extracto de levadura (Carter 1975; Boughton y Thorns 1976)

Se suspendieron 50 G de levadura fresca de panadería en 100 ml de KH_2PO_4 0.2M. Se calentó a 80° - 85° C durante 20 minutos y se clarificó mediante la filtración con cartuchos Millipore "Lifeguard" CP-15, se ajustó el pH a 7.6 con una solución 1N de NaOH. Se esterilizó por filtración (membranas Millipore, 0.22 μm) y se almacenó a -20° C hasta su uso.

3.12.2 Medio HP "*hyopneumoniae*" modificado por Friis (Boughton y Thoms 1976):

Solución salina balanceada modificada por Hanks	152.0 ml
Extracto de levadura	18.0 ml
* agua desionizada	225.0 ml
* Infusión cerebro corazón (BHI, Difco)	2.5 g
* Caldo PPLO (Difco)	2.5 g
*Rojo de fenol (sol. 0.2%)	3.5 g
*DNA	0.02 g
Bacitracina	75.0 mg
Meticilina	75.0 mg
Sulfato de Kanamicina	1.0 mg/ ml
Suero inactivado de caballo (56° C/ 15min)	125.0 ml

Se ajustó el pH a 7.4 con una solución al 7.5% de bicarbonato de sodio. El medio ya preparado se esterilizo por filtración (0.22 μ m) y se distribuyo en tubos de 3 x 100 mm con tapón de baquelita a razón de 4.5 ml encada uno.

*Se esterilizó en autoclave 121°/ 15 libras/ 15 minutos.

3.12.2.1 Solución salina balanceada modificada por Hanks:

Solución "A"

Agua desionizada	400.0 ml
NaCl	80.0g
KCl	4.00 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	1.00 g
MgCl ₂ 6H ₂ O	1.00 g
CaCl ₂	1.40 g
Agua desionizada hasta	500.0 ml

Solución "B"

Agua desionizada	400.0 ml
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	1.50 g
KH ₂ PO ₄	0.60 g
Agua desionizada hasta	500.0 ml

Al momento de su uso 25 ml de la solución "A" se mezcló con agua desionizada hasta 400 ml, después se agregó 25 ml de la solución "B" y se aforo con agua desionizada hasta 500 ml.

3.12.3 Medios Sólidos. (Manual de Técnicas y procedimientos. Laboratorio de Microbiología de las enfermedades respiratorias de los cerdos, FES Cuautitlán -UNAM).

3.12.3.1 Medio de Friis (Boughton y Thoms 1976):

Infusión cerebro corazón (BHI, Difco)	5.00 g
PPLO caldo (Difco)	5.00 g
Rojo de fenol (sol. 0.2%)	7.00 ml
Agar noble (Difco)	9.00 g
DNA	0.02 g
Agua desionizada	450.0 ml

Se ajustó el pH a 7.0, con una solución 0.1 N de NaOH y se esterilizó en el autoclave manteniéndose a 45°-50° C en baño maría, se agregaron en forma aséptica los siguientes compuestos:

Sol. Salina balanceada modificada de Hanks	304.0 ml
Extracto de levadura	36.0 ml
Suero inactivado de caballo	250.0 ml
Meticilina	150.0 mg
Sulfato de kanamicina	1.0 mg /ml

Se mezcló y se distribuyó en cajas de Petri de 100 mm de diámetro

3.12.4 Medios Líquidos para Caracterización Bioquímica.

3.12.4.1 Medio de Arginina (hidrólisis):

PPLO caldo (Difco)	10.0 g
L-Arginina HCl	5.0 g
Rojo de fenol	6.3 ml
Agua desionizada hasta	250.0 ml

Se ajustó el pH a 7.0 con una solución 0.1 N de NaOH y se esterilizó por filtración (membranas Millipore de 0.22 µm), agregando en forma aséptica los siguientes compuestos, previamente esterilizados:

Suero inactivado de caballo	100.0 ml
Extracto de levadura	50.0 ml
Sulfato de kanamicina	1.0 mg/ ml

3.12.4.2 Medio de Glucosa (fermentación):

Este medio se preparó tomando como base el medio de Friis y solo se le adicionó glucosa en una proporción de 1g por 1000 ml de medio líquido.

Tanto el medio de arginina como el medio de glucosa se distribuyeron en tubos de 13 x 100 mm con tapón de baquelita a razón de 4.5 ml por tubo y se almacenaron a 4° C.

3.13 Soluciones.

Se prepararon una serie de soluciones que se emplearon para realizar las pruebas bioquímicas bacteriológicas así como para realizar las pruebas serológicas de inhibición de crecimiento de micoplasmas.

3.13.1 Solución para la prueba de dependencia de esteroides.

La solución de digitonina al 1.5% (Friis 1975) se esterilizó por filtración (membranas Millipore de 0.22 μ m), se humedecieron discos de papel filtro previamente esterilizados, y se secaron a 37° C, se almacenaron a 4° C.

3.13.2 Solución de azul de metileno para la prueba de producción de peróxido de hidrógeno.

Se preparó una solución al 0.1% de azul de metileno en agua destilada, se esterilizó en autoclave y se almacenó a 4° C.

3.13.3 Solución modificada de Alsever.

Glucosa	20.05 g
NaCl	4.2 g
Citrato de sodio	8.0 g
Ácido cítrico	0.55 g
Agua destilada	1000.0 ml

Se esterilizó por filtración (membranas Millipore de 0.22 μ m) y se almacenó a 4° C.

3.14 Antisuero de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

3.14.1 Se empleó un antisuero homólogo de *Mycoplasma hyopneumoniae*, preparado en Laboratorio de Microbiología de las enfermedades respiratorias de los cerdos, FES Cuautitlán -UNAM, en una dilución, 1:20 con una solución balanceada de fosfatos al 0.01 M a pH 7.2.

4. RESULTADOS

4.1. Aislamientos de campo de *Haemophilus parasuis*.

De los dieciocho lechones de diferentes edades. Se encontró que en los pulmones las lesiones se caracterizaron por abscesos multifocales, hidrotórax, hidropericardio, adherencias craneales y parietales, ascitis severa, adherencias hepáticas, peritonitis.

Las muestras que fueron procesadas y que resultaron con aislamientos positivos a *Haemophilus parasuis* se indican en el cuadro 3 y los resultados a las pruebas bioquímicas en el cuadro 4.

Cuadro 3. Aislamientos de *Haemophilus parasuis*, encontrado en los tejidos y líquidos corporales de los cerdos con signos clínicos respiratorios y/o nerviosos.

Muestra	Aislamiento
Líquido pericardico (4 muestras)	NEGATIVO
Líquido sinovial (6 muestras)	POSITIVO (2 muestras)
Líquido cefalorraquídeo (3 muestras)	POSITIVO (1 muestras)
Líquido ascítico (4 muestras)	POSITIVO(2 muestras)
Líquido de hidrotórax (2 muestras)	NEGATIVO
Pulmones (18 muestras)	POSITIVO (3 muestras)
Corazones (6 muestras)	NEGATIVO

Cuadro 4. Identificación con pruebas bioquímicas de las cepas de *Haemophilus parasuis* aisladas de cerdos enfermos.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS	AISLAMIENTOS	% REFERENCIA
Factor V	8/8	100
Factor X	0/8	0
Indol	0/8	0
Urea	0/8	0
Hemólisis	0/8	0
CAMP	0/8	0
Catalasa	8/8	100
Oxidasa	5/8	53
Nitratos	8/8	100
Nitritos	0/8	0
H ₂ S	8/8	82
Arabinosa	0/8	0
Ribosa	7/8	93
Xylosa	0/8	0
Glucosa	8/8	100
Lactosa	0/8	0

4.2. Preparación de los inóculos.

4.2.1. *Haemophilus parasuis*.

Se preparó el inóculo utilizando la cepa de referencia 19417 ajustándolo a 1.5×10^8 bacterias/ml, y se nebulizó un total de 27 ml por grupo desafiado en un tiempo de 30 minutos de nebulización.

4.2.2. *Mycoplasma hyopneumoniae*.

El lechón que fue inoculado con la biomasa preparada a partir de la pastilla de *Mycoplasma hyopneumoniae* cepa 194, se sacrificó a los 19 días posdesafío, encontrándose solo 1% de lesión pulmonar (LP), con daños característicos de neumonía enzoótica. Con las muestras tomadas de las zonas de lesionadas del lechón anterior se elaboró un macerado pulmonar, el cual se aplicó a dos lechones de iguales condiciones sanitarias al empleado anteriormente y se sacrificaron a los 19 días posdesafío, obteniendo un 7% de LP características de neumonía enzoótica.

4.2.3. *Mycoplasma hyorhinis*.

Se preparó el inóculo con la cepa 17981 (cepa Iowa), ajustándolo a 1×10^4 UCC/ml, en un total de 10 ml por cerdo.

4.3. Status sanitario de los cerdos en experimentación.

En el cuadro 5 se resumen los resultados serológicos practicados contra *Actinobacillus pleuropneumoniae* y el Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (PRRS), los cuales resultaron negativos para los serotipos 1, 3, 5 y 7 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y de igual forma para PRRS.

Cuadro 5. Resultado de los diagnósticos serológicos encontrados en los animales de experimentación.

GRUPO	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>				PRRS
	Serotipo 1	Serotipo 3	Serotipo 5	Serotipo 7	
1	NEGATIVO				NEGATIVO
2	NEGATIVO				NEGATIVO
3	NEGATIVO				NEGATIVO
4	NEGATIVO				NEGATIVO
5	NEGATIVO				NEGATIVO
6	NEGATIVO				NEGATIVO
7	NEGATIVO				NEGATIVO
8	NEGATIVO				NEGATIVO

4.4. Aerosolización con los diversos inóculos.

Cada uno de los grupos que fue inoculado, fueron instalados en unidades separadas y a partir del día 1, se empezaron a tomar las temperaturas y a observar los signos clínicos respiratorios de disnea en reposo y de esfuerzo.

4.4.1. Signología

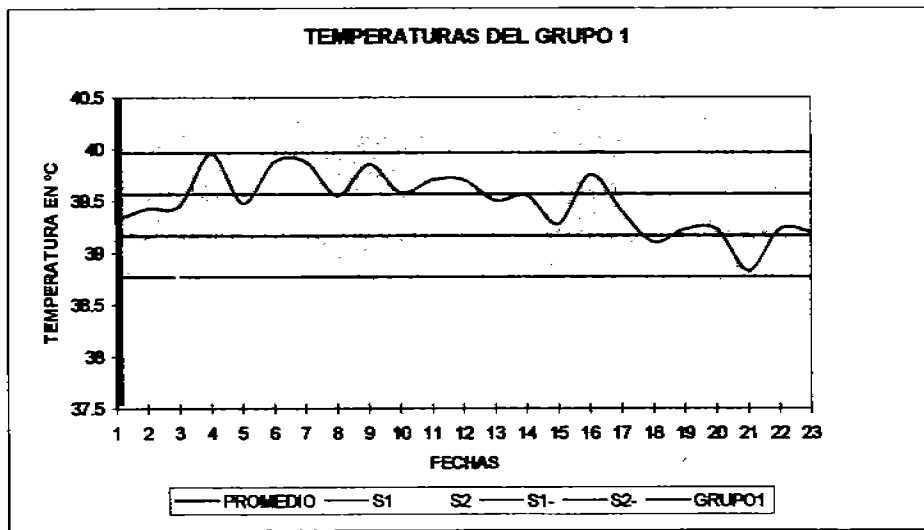
4.4.1.1. Temperaturas.

Durante 23 días se registraron las temperaturas a cada uno de los cerdos de cada grupo y en el Cuadro 6, se observan los datos de registro de temperaturas expresadas en promedio de cada grupo experimental. No se encontró en ninguno de los grupos una elevación de la temperatura corporal por arriba de lo normal fisiológicamente, así como cuando se utilizaron los promedios del grupo 8 como punto de referencia, lo cual se observa en las gráficas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8.

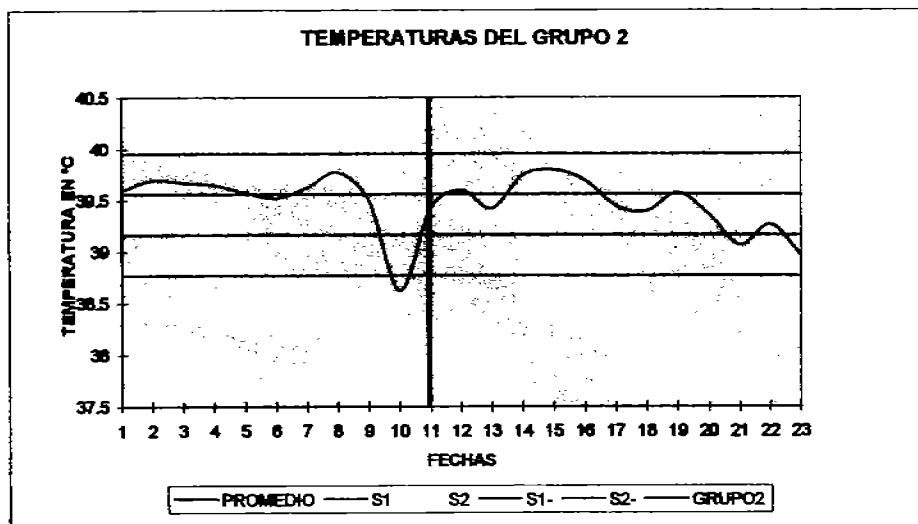
Cuadro 6. Temperaturas registradas por promedio durante los 23 días del experimento.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
GRUPO 1	39.325	39.425	39.45	39.95	39.475	39.875	39.875	39.55	39.85	39.575
GRUPO 2	39.6	39.7	39.675	39.65	39.575	39.525	39.625	39.775	39.5	38.625
GRUPO 3	39.125	39.35	40	39.5	39.65	39.45	39.35	39.6	39.7	39.7
GRUPO 4	39.625	40.05	40.1	39.9	40.05	40.125	39.925	39.7	39.925	39.625
GRUPO 5	39.55	39.825	39.925	39.7	39.5	39.825	39.8	39.5	39.75	39.825
GRUPO 6	39.625	39.8	39.925	39.625	39.85	39.95	39.925	39.625	39.675	39.6
GRUPO 7	39.8	39.725	39.9	40	40.025	39.8	39.975	39.425	39.425	38
GRUPO 8	39.3	39	38.833	39.6	39.3	40.05	40	39.85	40.15	40.05
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
GRUPO 1	39.7	39.7	39.5	39.55	39.275	39.75	39.4	39.1	39.225	39.225
GRUPO 2	39.425	39.6	39.425	39.75	39.8	39.7	39.45	39.4	39.575	39.366
GRUPO 3	39.866	39.633	39.866	39.733	39.566	39.4	39.266	39.566	39.7	39.166
GRUPO 4	39.85	39.925	39.925	39.8	39.625	39.7	39.375	39.45	39.475	39.2
GRUPO 5	39.4	39.975	39.75	39.55	39.8	39.475	39.475	39.525	39.625	39.45
GRUPO 6	39.75	39.825	39.4	39.625	39.2	39.6	39.375	38.9	39.675	39.275
GRUPO 7	39.1	39.45	39.4	39.625	39.35	39.8	39.35	39.225	39.3	39.5
GRUPO 8	39.7	39.7	39.5	39.55	39.275	39.75	39.4	39.1		
	21	22	23							
GRUPO 1	38.825	39.225	39.2							
GRUPO 2	39.066	39.266	38.966							
GRUPO 3	39.566	39.5	39.366							
GRUPO 4	39.05	39.2	39							
GRUPO 5	39.275	39.275	39.3							
GRUPO 6	38.975	39.1	38.575							
GRUPO 7	39.125	39.15	38.9							
GRUPO 8										

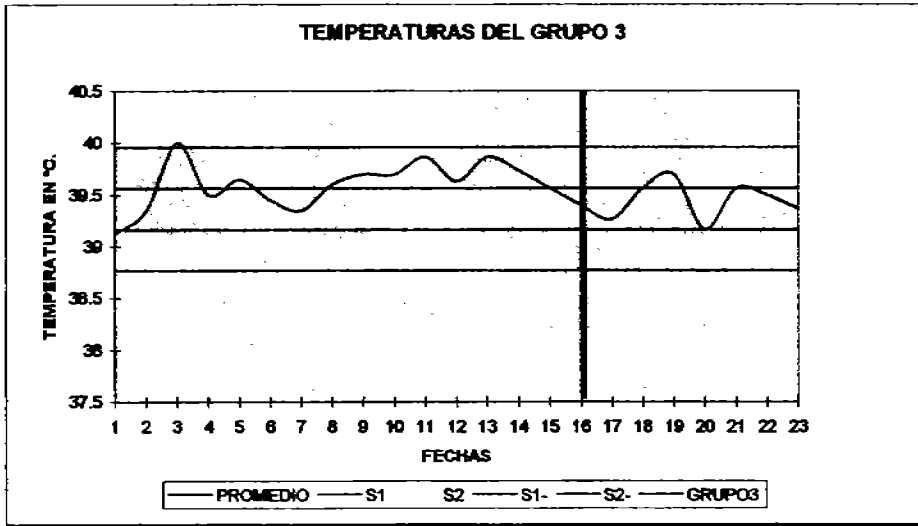
Gráfica 1. Registro del promedio de temperaturas del Grupo 1.



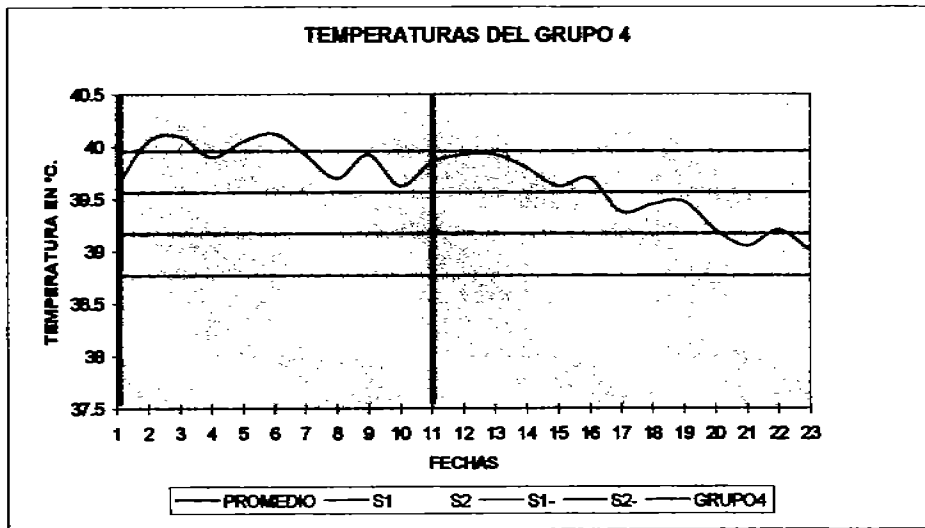
Gráfica 2. Registro del promedio de temperaturas del Grupo 2.



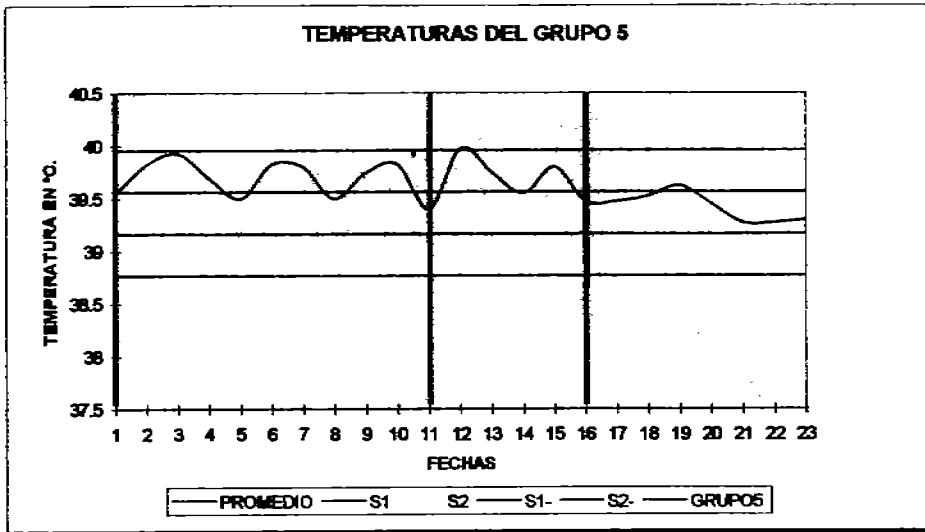
Gráfica 3. Registro del promedio de temperaturas del Grupo 3.



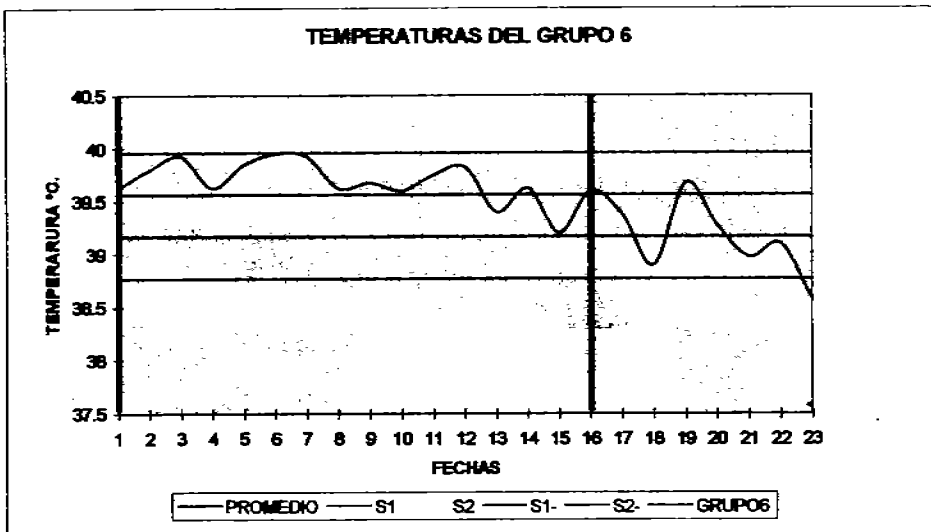
Gráfica 4. Registro del promedio de temperaturas del Grupo 4.



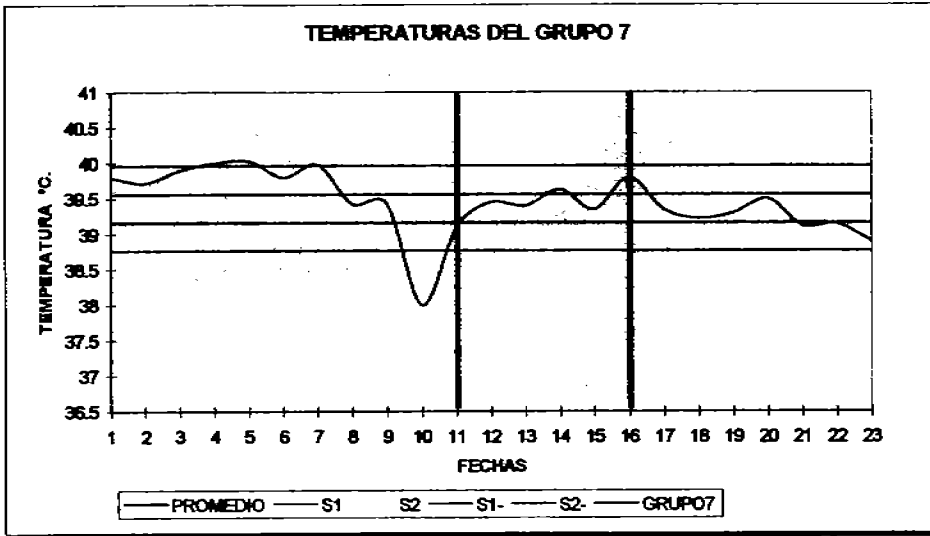
Gráfica 5. Registro del promedio de temperaturas del Grupo 5.



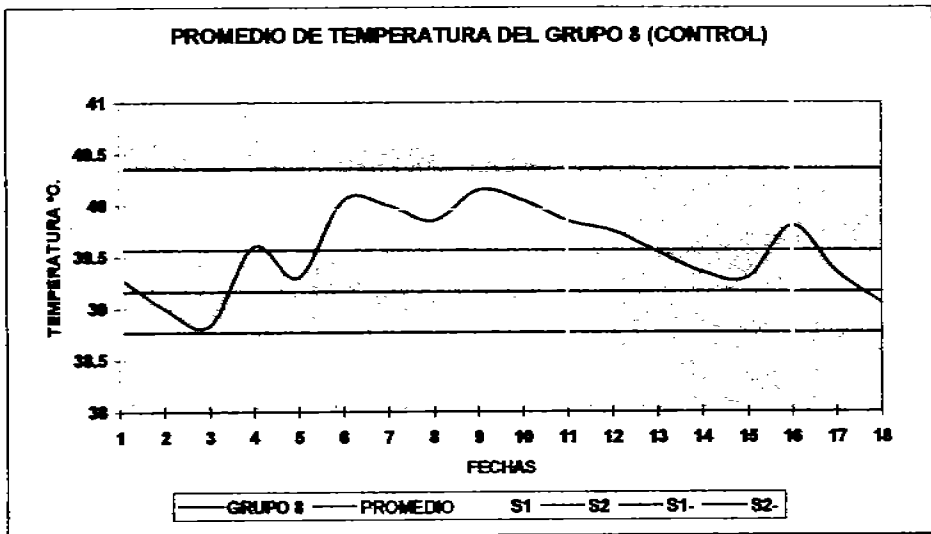
Gráfica 6. Registro del promedio de temperaturas del Grupo 6.



Gráfica 7. Registro del promedio de temperaturas del Grupo 7.



Gráfica 8. Registro del promedio de temperaturas del Grupo 8.



4.4.1.2. Signos clínicos.

La evaluación de los signos clínicos se resume en el cuadro 7 y no se presentó ningún tipo de manifestación clínica antes del desafío en todos los grupos.

Los signos clínicos posdesafío fueron los siguientes:

Grupo 1, al día 5 posdesafío, se manifestaron signos respiratorios como estornudos, tos, disnea, estertores húmedos y postración de todos los animales.

Grupo 2, al día 12, se encontró tos seca, estertores húmedos, descarga nasal y respiración abdominal.

Grupo 3, al día 17, se encontró disnea, estertores húmedos y tos.

Grupo 4, al día 7, se observaron estornudos, tos, disnea, estertores húmedos. Al día 17 se agravaron todos los signos.

Grupo 5, al día 7 se manifestaron signos respiratorios moderados, como disnea, tos seca, estornudos y estertores húmedos. Al día 12, los signos fueron agravándose, al día 17 se agravaron y denotaron respiración abdominal.

Grupo 6, al día 7 se manifestaron signos respiratorios como disnea, tos seca, y estornudos, al día 17 se observó disnea, respiración abdominal y estertores húmedos.

Grupo 7, se encontró ligera disnea al día 12, estertores y boqueo, para el día 17 existía una franca disnea, estertores húmedos, descarga nasal y respiración abdominal.

Grupo 8, no se observaron signos clínicos durante todo el desarrollo del experimento.

Cuadro 7. Resumen de los signos clínicos.

Grupo	PREDESAFIO	<i>M. hyopneumoniae</i>	<i>M. hyorhinalis</i>	<i>H. parasais</i>
1	NO SIGNOS	DIA 5 ,ESTORNUDOS,	TOS SECA, DISNEA,	ESTERTORES HUMEDOS, POSTRACION
2	NO SIGNOS	NO SIGNOS	DIA 12, DISNEA, ESTERTORES HUMEDOS, TOS SECA, DESCARGA NASAL,	RESPIRACION ABDOMINAL.
3	NO SIGNOS	NO SIGNOS	NO SIGNOS	DIA 17, DISNEA, ESTERTORES HUMEDOS, TOS.
4	NO SIGNOS	DIA 7, = GRUPO 1	DIA 12, SE AGRAVAN LOS SIGNOS, BOQUEO, MOCO.	
5	NO SIGNOS	DIA 7, = GRUPO 1	DIA 12, = GRUPO 4	DIA 17, SIGNOS SIMILARES AL GRUPO 4, RESPIRACION ABDOMINAL
6	NO SIGNOS	DIA 7, = GRUPO 1	NO SIGNOS	DIA 17,DISNEA, RESPIRACION ABDOMINAL, ESTERTORES HUMEDOS
7	NO SIGNOS	NO SIGNOS	DIA 12, LIGERA DISNEA, ESTERTORES, BOQUEO	DIA 17, DISNEA, ESTERTORES, DESCARGA NASAL, RESPIRACION ABDOMINAL
8	NO SIGNOS	NO SIGNOS	NO SIGNOS	NO SIGNOS

4.5. Lesiones encontradas a la necropsia.

Posteriormente al sacrificio de los animales, se evaluaron las lesiones pulmonares por medio de la técnica de Straw (1966) modificada, para poder determinar el porcentaje de lesión pulmonar individual y posteriormente el porcentaje de lesión pulmonar promedio del grupo. Cuadro 8.

Grupo 1, el porcentaje individual se puede observar en el cuadro 8, en donde el promedio del grupo fue de 2%, encontrándose en 2 de los 4 animales lesiones pulmonares tipo consolidación de grado leve con resolución. Figura 1.

Grupo 2, el porcentaje individual de lesión pulmonar se observa en el cuadro 8, el porcentaje promedio de lesión pulmonar fue de 3%, donde se encontró en 2 de los 4 cerdos lesiones pulmonares tipo consolidación leves con resolución de grado leve. Figura 2.

Grupo 3, el porcentaje de lesión pulmonar promedio se encuentra en el cuadro 8, el porcentaje de lesión pulmonar promedio fue de 13%, correspondiendo a 3 de los 4 cerdos del grupo, donde se presentaron lesiones pulmonares tipo consolidación de leves a severas con adherencias moderadas. Figura 3.

Grupo 4, se encontró un promedio de lesión pulmonar de 3%, los valores individuales se observan en el cuadro 8, las lesiones encontradas en 3 de los 4 cerdos con lesiones tipo consolidación leves con resolución. Figura 4.

Grupo 5, el porcentaje promedio de lesión pulmonar fue de 10%, las lesiones encontradas en 3 de los 4 cerdos fueron del tipo consolidación leve con resolución, los valores individuales están referidos en el cuadro 8. Figura 5.

Grupo 6, las lesiones pulmonares encontradas en 2 de los 4 cerdos, fueron del tipo consolidación severa, con adherencias severas en lóbulos apicales,

cardiacos y diafragmáticos, presentando hidrotórax, con un 7% de lesión pulmonar promedio. Figura 6.

Grupo 7, en este grupo se encontraron las lesiones pulmonares más severas, con un 29 % de lesión pulmonar promedio, las cuales correspondieron a 2 de los 3 cerdos con lesiones tipo consolidación muy severas, con adherencias en lóbulos apicales, cardiacos y diafragmáticos e hidrotórax severo, además de presentar un aumento en el líquido sinovial de varias articulaciones. Figura 7.

Grupo 8, en los 2 cerdos correspondientes a este grupo los resultados fueron sin cambios patológicos aparentes (SCPA). Figura 8.

Cuadro 8. Resumen de las lesiones macroscópicas encontradas en todos los grupos experimentales.

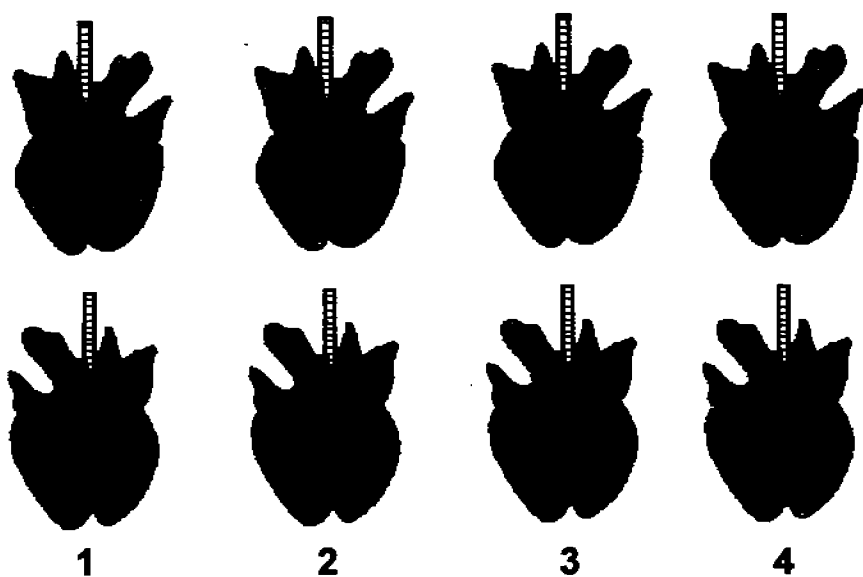
GRUPO	LESIONES MACROSCÓPICAS	PORCENTAJE INDIVIDUAL DE LESIÓN PULMONAR	PORCENTAJE LESIÓN PULMONAR PROMEDIO
1	2/4, Pulmonares leves con resolución	0, 0, 3, 4	2
2	2/4, pulmonares leves con resolución	0, 3, 0, 5	3
3	3/4, Pulmonares leves a severas con adherencias moderadas	0, 4, 2, 43	13
4	3/4, Pulmonares leves con resolución	2, 4, 4, 0	3
5	3/4, Leves a severas	5, 18, 0, 15	10
6	2/4, Pulmonares severas, con adherencias apicales, cardiacas y diafragmáticas severas, con hidrotórax	20, 0, 0, 4	7
7	2/3, Pulmonares muy severas con adherencias apicales, cardiacas y diafragmáticas severas, hidrotórax y líquido articular	0, 44, 0, 41	29
8	0/2, SCPA	0, 0	0

4.5.1. Análisis estadísticos.

Se Realizó bajo un diseño completamente al azar, para ello se utilizó la metodología de los Modelos Lineales Generalizados (GLM, por sus siglas en inglés), procedimiento incluido en el Sistema de Análisis Estadístico SAS.

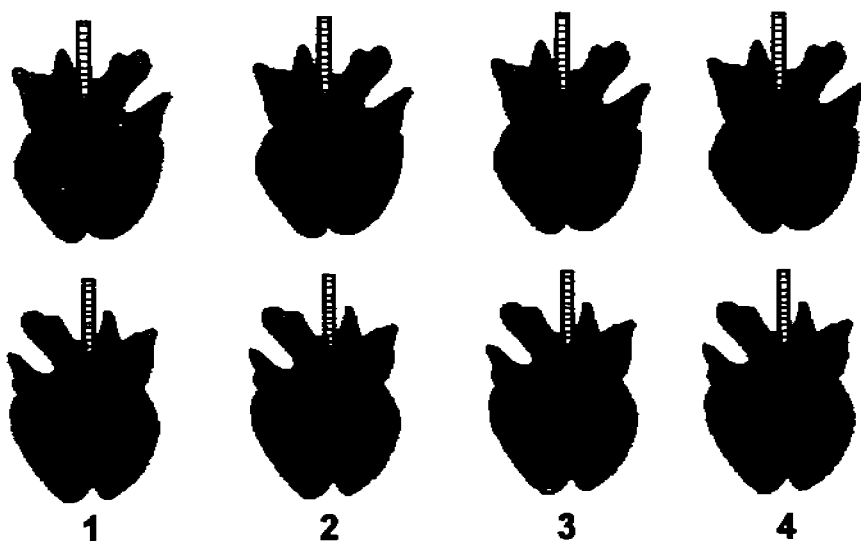
Los resultados obtenidos de la planimetría fueron analizados encontrándose que por los resultados de las lesiones macroscópicas los grupos fueron homogéneos ($P>0.99$).

Figura 1. Grupo 1
Mycoplasma hyopneumoniae.
2 % Lesión Pulmonar.



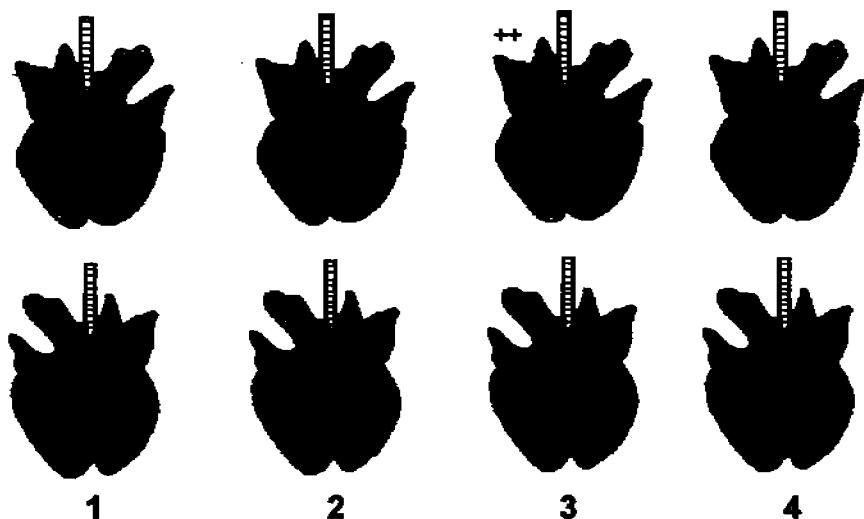
Las zonas de color rojo firme indican las lesiones tipo consolidación que se encontraron en los pulmones, tanto dorsal como ventralmente.

Figura 2. Grupo 2
***Mycoplasma hyorhinis*.**
3 % Lesión Pulmonar.



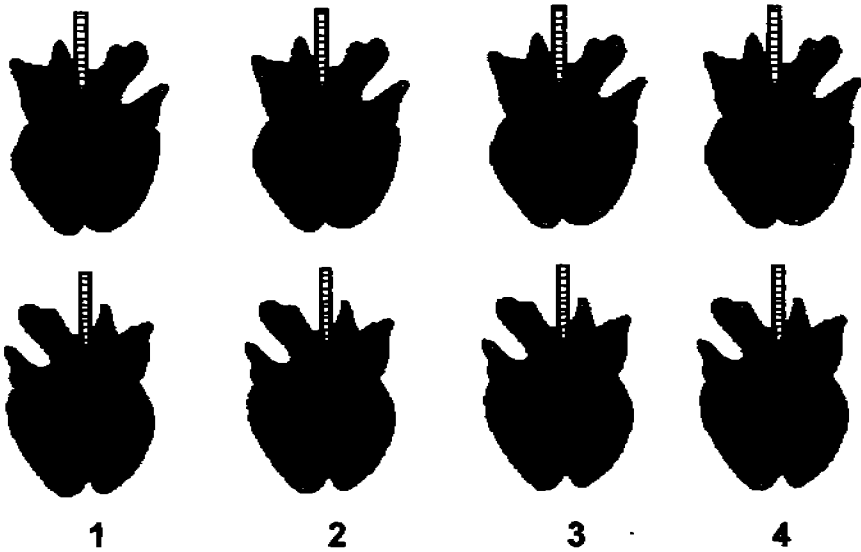
Las zonas de color rojo firme indican las lesiones tipo consolidación que se encontraron en los pulmones, tanto dorsal como ventralmente.

Figura 3. Grupo 3
***Haemophilus parasuis*.**
13 % Lesión Pulmonar.



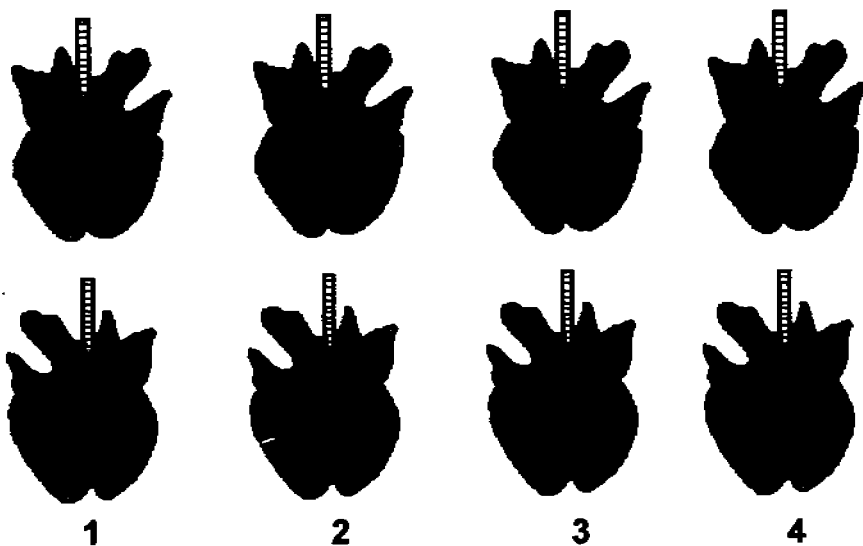
Las zonas de color rojo firme indican las lesiones tipo consolidación que se encontraron en los pulmones, tanto dorsal como ventralmente, las cruces que se observan son indicativas de las adherencias encontradas.

Figura 4. Grupo 4
Mycoplasma hyopneumoniae* – *Mycoplasma
hyorhinis.
3 % Lesión Pulmonar.



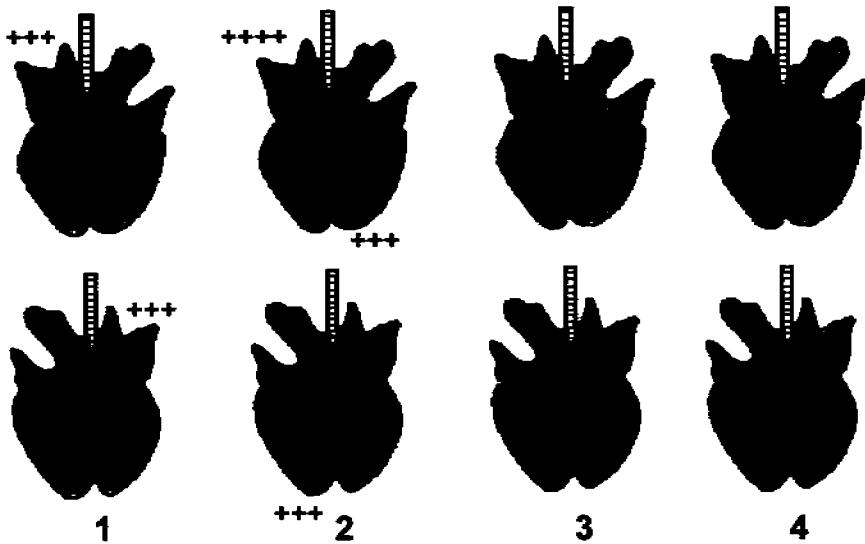
Las zonas de color rojo firme indican las lesiones tipo consolidación que se encontraron en los pulmones, tanto dorsal como ventralmente.

Figura 5. Grupo 5
M. hyopneumoniae* - *M. hyorhinis* - *H.
parasuis.
10 % Lesión Pulmonar.



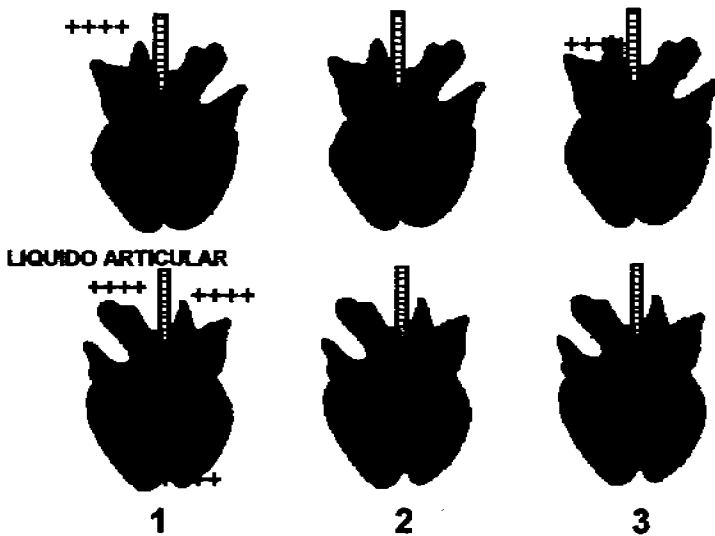
Las zonas de color rojo firme indican las lesiones tipo consolidación que se encontraron en los pulmones, tanto dorsal como ventralmente.

Figura 6. Grupo 6
***Mycoplasma hyopneumoniae* - *Haemophilus parasuis*.**
7 % Lesión Pulmonar.



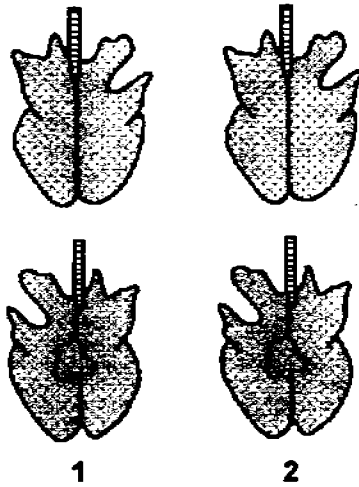
Las zonas de color rojo firme indican las lesiones tipo consolidación que se encontraron en los pulmones, tanto dorsal como ventralmente, las cruces que se observan son indicativas de las adherencias encontradas y la presencia de líquido capturado en las adherencias (hidrotórax), el cual no se presentó en los demás grupos.

Figura 7. Grupo 7
***Mycoplasma hyorhinis* – *Haemophilus parasuis*.**
29 % Lesión Pulmonar.



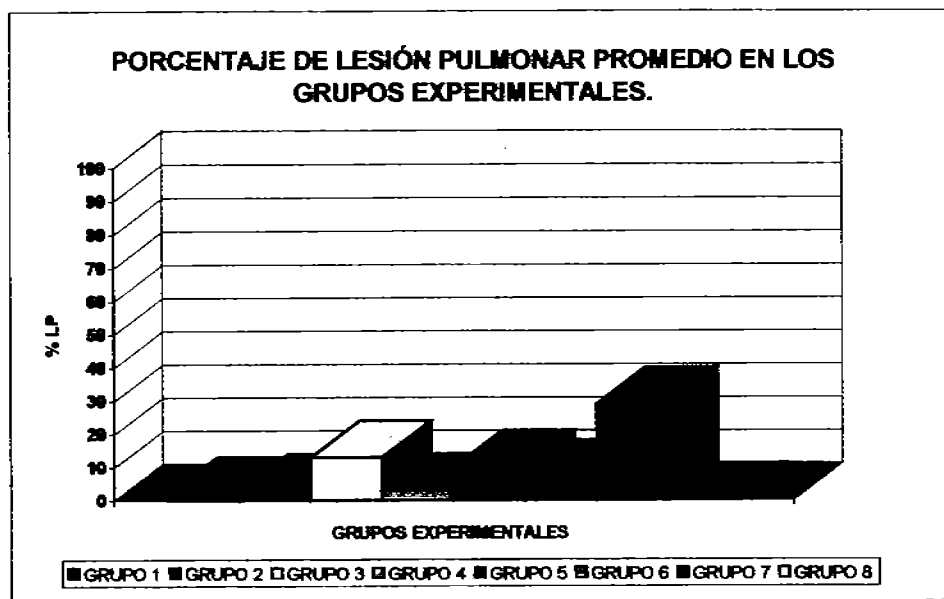
Las zonas de color rojo firme indican las lesiones tipo consolidación que se encontraron en los pulmones, tanto dorsal como ventralmente, las cruces que se observan son indicativas de las adherencias encontradas. Se indica la presencia de líquido sinovial solo en este grupo, en mayor cantidad de lo normal en varias articulaciones.

**Figura 8. Grupo 8
Control.
0 % Lesión Pulmonar.**



En este caso la evaluación indicó sin cambios patológicos aparentes (SCPA).

Gráfica 9. Porcentaje del promedio de las lesiones pulmonares de todos los grupos experimentales.



4.5.2. Análisis estadístico por grupos

Los datos de porcentaje de lesión pulmonar fueron evaluados por un diseño completamente al azar, encontrándose que todos los grupos son homogéneos ($P > 0.99$). En cuanto a la relación existente entre el porcentaje de lesión pulmonar y la ganancia de peso o la conversión alimenticia, los datos también indicaron ser homogéneos ($P > 0.99$).

4.6. Lesiones microscópicas.

En el Cuadro 9, se describen en forma individual las principales lesiones microscópicas, encontradas en los pulmones de los cerdos desafiados con los agentes etiológicos y en el cuadro 10 un resumen de las mismas.

Cuadro 9. Descripción de las lesiones microscópicas encontradas en los pulmones de los cerdos desafiados (histopatología).

GRUPO	ÓRGANO	DESCRIPCIÓN	Dx MORFOLÓGICO
1	Pulmón.	En el que se observó moderada congestión, así como presencia de hemorragias zonales intraseptales, hubo leve reacción del tejido linfoide asociado a pulmón y presencia de escasos macrófagos alveolares reactivos.	Congestión y hemorragia intraseptal zonal, con neumonía no supurativa leve multifocal.
1	Pulmón.	No se observaron cambios significativos microscópicamente.	SCPA
1	Pulmón.	Se observó moderada congestión y hemorragias, hubo leve reacción del tejido linfoide asociado a pulmón y presencia de leve edema interlobulillar.	Congestión y hemorragia moderada difusa.
1	Pulmón.	Se observó moderada congestión, hubo leve reacción del tejido linfoide asociado a pulmón y presencia de leve edema interlobulillar, además de ligera proliferación de neumocitos tipo II, en un bronquio en la luz se apreció la presencia de un material amarillo ocre.	Congestión leve difusa con broncoaspiración zonal.
2	Pulmón.	Se observó severa congestión, así como presencia de hemorragias zonales leves, hubo ligera reacción del tejido linfoide asociado a pulmón y descamación severa del epitelio bronquial.	Congestión y hemorragia zonal.
2	Pulmón.	Se observó moderada congestión, así como presencia de hemorragias zonales moderadas, hubo leve reacción del tejido linfoide asociado a pulmón y presencia de moderado edema interlobulillar.	Congestión y hemorragia zonal.
2	Pulmón.	Se observó moderada congestión, hubo leve reacción del tejido linfoide asociado a pulmón y presencia de moderado edema interlobulillar.	Congestión leve difusa.
3	Pulmón.	Se observó la presencia de abundante reacción inflamatoria compuesta principalmente por neutrófilos y picocitos, los cuales se localizaron tanto al nivel de la luz alveolar como bronquial, además en la luz alveolar se apreció la presencia de abundantes macrófagos reactivos, células plasmáticas y linfocitos así como proliferación moderada de neumocitos tipo II, también se evidenciaron zonas de hemorragia en el parénquima, y abundante edema interlobulillar. También se observó leve hiperplasia linfoide del tejido asociado a pulmón.	Bronconeumonía severa difusa con proliferación de neumocitos tipo II y hemorragias severas difusas.
3	Pulmón.	Se observó leve congestión, así leve reacción del tejido linfoide asociado a pulmón.	Congestión pulmonar leve difusa.

GRUPO	ÓRGANO	DESCRIPCIÓN	Dx MORFOLÓGICO
3	Pulmón.	Se observó proliferación leve de neumocitos tipo II, con presencia de moderado edema interlobulillar.	
4	Pulmón.	Se observó moderada congestión, hay leve reacción del tejido linfoide asociado a pulmón y presencia de moderado edema interlobulillar.	Congestión leve difusa.
4	Pulmón.	Se observó moderada congestión, hay leve reacción del tejido linfoide asociado a pulmón y presencia de moderado edema interlobulillar.	Congestión leve difusa.
4	Pulmón.	Se observó moderada congestión, y escasas zonas de hemorragia así como presencia de moderado edema interlobulillar.	Congestión y hemorragia leve difusa.
4	Hígado.	Se observó leve disociación de los cordones hepáticos así como la presencia de escasos focos de necrosis los cuales se localizan a nivel mesozonal.	Hepatitis necrótica mesozonal leve multifocal.
4	Pulmón.	Se observó leve congestión y hemorragias, hay leve reacción del tejido linfoide asociado a pulmón y presencia de leve edema interlobulillar, además de leve proliferación de neumocitos tipo II	Congestión y hemorragia leve difusa.
5	Pulmón.	En el que se observó moderada congestión, así como presencia de hemorragias zonales leves, hubo leve reacción del tejido linfoide asociado a pulmón y presencia de colonias bacterianas (cambios postmortem)	Congestión y hemorragia zonal.
5	Hígado.	Se observó congestión centrolobulillar moderada difusa con disociación leve de los cordones hepáticos así como la presencia de moderados focos de necrosis los cuales se localizaron a nivel mesozonal, así como reacción inflamatoria periportal compuesta principalmente por linfocitos, macrófagos y células plasmáticas, además de la presencia de un foco de hematopoyesis	Hepatitis necrótica mesozonal moderada multifocal.
5	Pulmón.	Se observó moderada congestión, además de proliferación leve de neumocitos tipo II	Congestión y hemorragia zonal.
5	Pulmón.	Se observó la presencia de abundante reacción inflamatoria compuesta principalmente por neutrófilos y piocitos, los cuales se localizan tanto al nivel de la luz alveolar como bronquial, además en la luz alveolar se apreció la presencia de abundantes macrófagos reactivos, así como abundante edema interlobulillar. También se apreció leve hiperplasia linfoide del tejido asociado a pulmón.	Bronconeumonía severa difusa.
5	Pulmón.	Se observó moderada congestión y hemorragias, hay leve reacción del tejido linfoide asociado a pulmón y presencia de leve edema interlobulillar.	Congestión y hemorragia leve difusa.
6	Pulmón.	Se observó moderada congestión, así como presencia de hemorragias zonales moderadas, hubo leve reacción del tejido linfoide asociado a pulmón y presencia de moderado edema interlobulillar.	Congestión y hemorragia zonal.

GRUPO	ÓRGANO	DESCRIPCIÓN	Dx MORFOLÓGICO
6	Hígado.	Presentó leve congestión centrolobulillar, con moderada disociación de los cordones hepáticos	
6	Hígado.	Se observó congestión centrolobulillar moderada difusa con disociación leve de los cordones hepáticos así como la presencia de escasos focos de necrosis los cuales se localizaron a nivel mesozonal, así como moderada reacción inflamatoria periportal compuesta principalmente por linfocitos, macrófagos y células plasmáticas, además de la presencia de escasos focos de hematopoyesis.	Hepatitis no supurativa periportal moderada multifocal.
6	Pulmón.	Se observó leve congestión y hemorragias, hay leve reacción del tejido linfoide asociado a pulmón y presencia de leve edema interlobulillar.	Congestión y hemorragia leve difusa.
6	Pulmón.	Se observó leve congestión y hemorragias, hay leve reacción del tejido linfoide asociado a pulmón y presencia de leve edema interlobulillar.	Congestión y hemorragia leve difusa.
6	Pulmón.	Se observó moderada congestión, hubo leve reacción del tejido linfoide asociado a pulmón y presencia de leve edema interlobulillar, además de leve proliferación de neumocitos tipo II	Congestión leve difusa.
7	Pulmón.	Se observó engrosamiento moderado de las paredes alveolares, donde además de observar proliferación moderada de neumocitos tipo II también se aprecian macrófagos y linfocitos, También se apreció moderada hiperplasia linfoide del tejido asociado a pulmón.	Neumonía intersticial moderada difusa.
7	Pulmón.	Se observó engrosamiento moderado de las paredes alveolares, donde además de observar proliferación moderada de neumocitos tipo II también se aprecian macrófagos y linfocitos, en la luz alveolar se observó la presencia de abundantes macrófagos reactivos, así como congestión moderada difusa y escasas zonas de hemorragia. También se apreció moderada hiperplasia linfoide del tejido asociado a pulmón.	Neumonía intersticial moderada difusa.
7	Hígado.	Se observó congestión centrolobulillar moderada difusa con disociación moderada de los cordones hepáticos, así como moderada reacción inflamatoria periportal compuesta principalmente por linfocitos, macrófagos y células plasmáticas.	Hepatitis no supurativa periportal moderada multifocal.
7	Pulmón.	En el que se observó moderada congestión, hay leve reacción del tejido linfoide asociado a pulmón y presencia de leve edema interlobulillar, además de leve proliferación de neumocitos tipo II.	Congestión leve difusa.
8	Pulmón.	Sin cambios patológicos aparentes.	Sin cambios patológicos aparentes.
8	Pulmón.	Sin cambios patológicos aparentes.	Sin cambios patológicos aparentes.

Las identificaciones de 2 muestras fueron inteligibles, por lo que no se pudo identificar el grupo al que pertenecían. Por ello se eliminaron las descripciones histopatológicas.

Cuadro 10. Resumen de los hallazgos de histopatología encontrados en los pulmones de los animales inoculados.

GRUPOS	HALLAZGOS MICROSCÓPICOS
1	Trombos, tejido linfóide asociado a bronquio (BALT) activado, neumonía intersticial.
2	Hiperemia, hemorragia, macrófagos activados, BALT activado.
3	BALT activado, periarteritis, bronquiolos c/ detritos celulares, macrófagos activados y en destrucción, zonas de fibrosis, fibrina, polimorfonucleares en bronquiolo.
4	Septo interlobular engrosado, BALT activado, neumonía intersticial.
5	BALT activado, macrófagos activados, macrófagos en destrucción.
6	Hígado.- necrosis focal c/ acumulo de mononucleares. Pulmón similar al grupo 1.
7	BALT activado, neumonía intersticial, severas adherencias en hígado.
8	Sin cambios patológicos aparentes.

4.7. Estudios serológicos.

Cuadro 11. Resultado de los estudios serológicos de los sueros de los animales antes y después del desafío.

PRUEBA GRUPO	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>			<i>Haemophilus parasuis</i>	
	PREDESAFÍO	POSDESAFÍO		PREDESAFÍO	POSDESAFÍO
	ELISA	ELISA	IFA	AGLUTINACIÓN	AGLUTINACIÓN
1	NEGATIVO	+	+++	NEGATIVO	NEGATIVO
2	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
3	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	+
4	NEGATIVO	+	+++	NEGATIVO	NEGATIVO
5	NEGATIVO	+	++++	NEGATIVO	+
6	NEGATIVO	+	++++	NEGATIVO	+
7	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	+
8	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

IFA: Inmunofluorescencia indirecta

4.8. Reaislamiento de los agentes inoculados.

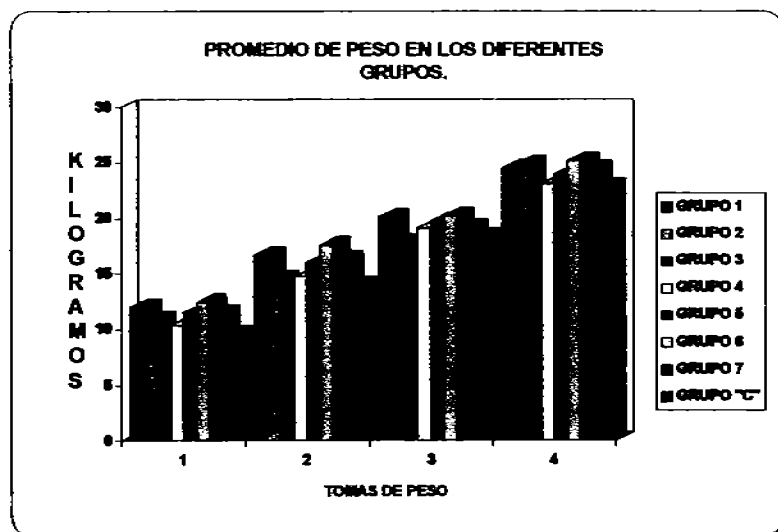
Cuadro 12. Recuperación de los agentes inoculados en los cerdos de los diversos grupos experimentales.

GRUPO	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	<i>Haemophilus parasuis</i>
1	+++	NEGATIVO	NEGATIVO
2	NEGATIVO	+++	NEGATIVO
3	NEGATIVO	NEGATIVO	+++
4	+++	+++	NEGATIVO
5	++	++	++
6	++	NEGATIVO	+++
7	NEGATIVO	++	++
8	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

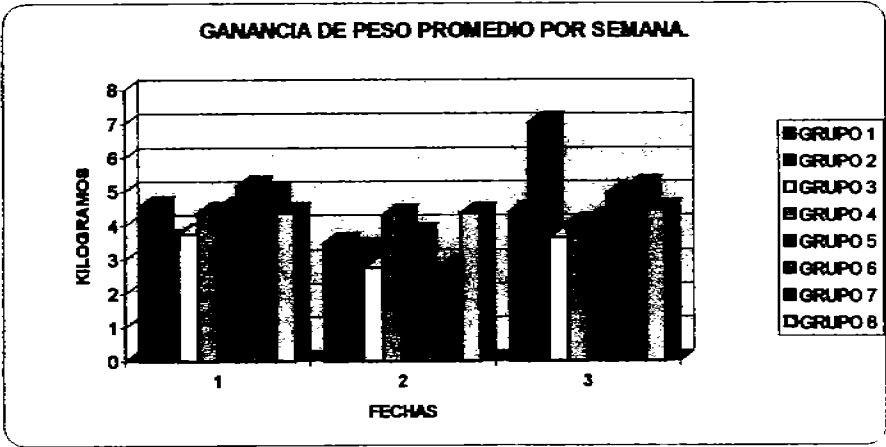
4.9. Determinación de los parámetros productivos.

Con los pesos y consumos tomados durante el experimento, se evaluaron la conversión alimenticia y la ganancia diaria de peso. Gráfica 10 y gráfica 11.

Gráfica 10. Peso promedio en los diversos grupos experimentales.



Gráfica 11. Ganancia de peso promedio por semana.



5. DISCUSIÓN.

Los problemas neumónicos hoy en día son la causa más importante de pérdidas económicas para el porcicultor, ya sea como decomiso en rastro o por una deficiente conversión alimenticia (Fernández y Lara 1994).

Existen evidencias de que hay una marcada interacción entre los agentes virales y bacterianos en la presentación de neumonías en todos los animales domésticos (Falcón 1989). Este efecto sinérgico, es más marcado cuando los agentes involucrados son dos agentes primarios, es decir que el daño que cada uno de estos puede producir separadamente en el tracto respiratorio, se ve todavía incrementado, cuando actúa conjuntamente con otro agente primario que afecte al tracto respiratorio. Como lo demostró Matthews y Pattison, en 1961 entre el virus de la FPC y *Haemophilus parainfluenzae* ó el experimento de Pijoan y Ochoa, en 1978, con virus vacunal de FPC y *Pasteurella multocida*. De igual manera se ha comprobado este tipo de fenómeno entre *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Pasteurella multocida* (Ciprián y col. 1988) y el de *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Yagihashi y col. 1984).

En la actualidad en México, se han presentado una serie de problemas de tipo neumónico, en donde según algunos investigadores se puede encontrar relacionado al *Haemophilus parasuis* con Micoplasmas. En 1994 el *Haemophilus parasuis* fue aislado de varios casos de campo por Trujano e Iglesias, indicando que debido a la falta de familiaridad con este agente, no se le esté dando la importancia que posiblemente puede tener en nuestro país.

Por lo resultados obtenidos nos damos cuenta que es mucho más sencillo aislar *Haemophilus parasuis* de líquidos de extravasación corporal, que de los pulmones, lo que confirma lo observado por Méndez-Trigo y col. (1996).

Encontramos resultados variables en algunas pruebas bioquímicas, indicando la importancia de probar toda la serie de pruebas bioquímicas completa, para descartar posibles fallos en los resultados y obtener una identificación correcta.

En la elaboración del inóculo de *Mycoplasma hyopneumoniae*, encontramos resultados similares a los indicados por Cruz y col. (1996), en donde en un primer pase *in vivo*, el porcentaje de lesión es mínimo y al realizar un segundo pase se encuentra un aumento en el porcentaje de lesión pulmonar, indicando esto el incremento en la virulencia de la cepa de *Mycoplasma hyopneumoniae*, al pasarlo por el modelo biológico blanco.

En la parte de evaluación del estado sanitario de los animales utilizados en la experimentación, es necesario indicar que los resultados obtenidos mostraron un estatus adecuado de todos los animales. En el caso de la valoración para el Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS), las muestras se corrieron en la Comisión México-Norteamericana, para la prevención y erradicación de la Fiebre Aftosa (CPA), donde los resultados obtenidos fueron negativos.

En el caso de la realización de los desafíos se llevó a cabo conforme a lo planeado en el protocolo inicial de trabajo, denotando la facilidad de realizar desafíos utilizando la cámara de nebulización, lo que nos ofrece una ruta de desafío más adecuada y parecida a la natural, en el caso de *Haemophilus parasuis*.

La evaluación de la temperatura corporal nos indicó que al utilizar los rangos de temperatura corporal del grupo control para evaluar los demás grupos, no encontramos valores promedio en ningún grupo que nos indicaran picos febriles, esto al entrar todas las mediciones diarias promedio dentro de dos sigmas superiores a la temperatura promedio del grupo control y dos sigmas inferiores al promedio del mismo grupo. Este punto nos llamó mucho la atención ya que esperábamos encontrar picos febriles que nos indicaran el desarrollo de las infecciones en cada grupo. Dentro del análisis estadístico los grupos resultaron homogéneos, sin diferencia estadísticamente significativa.

La parte de signología clínica, fue muy variada en cada uno de los grupos y a lo largo del desarrollo del experimento. Básicamente encontramos en los grupos desafiados con *Mycoplasma hyopneumoniae* la signología clínica genérica reportada por varios autores para este tipo de padecimientos (Armstrong 1982), observamos en el grupo 1, 2, 4, 5 y 6 estornudos, ligera disnea, tos seca y postración posteriores al desafío con *Mycoplasma hyopneumoniae*, la cual se fue complicando conforme se realizaban los desafíos subsecuentes con los otros patógenos. En el desarrollo de este experimento no contemplamos la necesidad de registrar las observaciones clínicas en un formato que nos permitiera convertir las observaciones en valores, para así poder utilizarlos de manera estadística. Esta situación se debió a que nuestro objetivo principal fue el porcentaje de lesión pulmonar.

En el caso de *Mycoplasma hyorhinis*, la signología encontrada también fue característica de un problema respiratorio, esto debido a que utilizamos una cepa marcada como causante de problemas respiratorios más que de tipo sistémico. Las manifestaciones clínicas fueron desde disnea, tos seca, descarga nasal, postración y respiración abdominal que es lo reportado en diferentes referencias bibliográficas (Ross 1999). Estas observaciones clínicas se fueron complicando en los respectivos grupos que tuvieron diferentes desafíos a lo largo del experimento.

Para *Haemophilus parasuis*, observamos inicialmente disnea, respiración abdominal y estornudos con tos, lo que de igual forma son signos clínicos sugestivos de problemas respiratorios que pudieran ser sugestivos de *Haemophilus parasuis*, los cuales se fueron complicando conforme avanzó el experimento en los grupos desafiados con otros agentes.

En el caso de los signos clínicos encontrados en los grupos 4, 5 y 7, en donde interactuaron *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Mycoplasma hyorhinis*, podemos inferir que estos signos clínicos fueron complicando el cuadro originalmente presentado, desafortunadamente no encontramos referencias que nos sirvieran de soporte para evaluar si las lesiones pudieran ser indicativas de una adición o sinergia entre ambos patógenos.

Los grupos 5 y 7 en donde interactuaron *Haemophilus parasuis* y *Mycoplasma hyorhinis*, también observamos un incremento en las manifestaciones clínicas, algunos autores han encontrado que es común aislar a estos agentes en combinación en cerdos con problemas clínicos, donde se encontraron en el 51.2% de pulmones evaluados para detectar el virus de PRRS (Kobayashi y col. 1996).

En los grupos 4, 5 y 6, donde se desafiaron *Haemophilus parasuis* y *Mycoplasma hyopneumoniae*, también pudimos detectar un incremento en las manifestaciones clínicas, lo cual nos indica de manera clara la posible acción aditiva o sinérgica de estos patógenos en conjunto.

En el grupo 5, en donde los tres patógenos participaron en los desafíos, observamos como de manera gradual conforme pasaba el tiempo, la acción de estos microorganismos complicaba las manifestaciones clínicas, a un grado de no poder diferenciar signos marcados como sugestivos de cada una de las enfermedades que producen de manera individual.

En lo referente a las lesiones macroscópicas pulmonares, encontramos una correlación entre lo observado clínicamente y las lesiones encontradas, es decir conforme se hacían los desafíos múltiples y se agravaban los signos clínicos en los diferentes grupos, encontramos más lesiones, en diversos tipos y en mayor escala.

Las lesiones encontradas en el grupo 1, desafiado con *Mycoplasma hyopneumoniae*, en el grupo 2 desafiado con *Mycoplasma hyorhinis* y en el grupo 3 que fue desafiado con *Haemophilus parasuis*, fueron características de cada uno de los patógenos utilizados, las cuales fueron de lesiones leves con resolución, para *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Mycoplasma hyorhinis*, a adherencias leves a severas con adherencias para *Haemophilus parasuis*.

Los porcentajes de lesión pulmonar promedio para grupo 1 de *Mycoplasma hyopneumoniae*, fueron menores a las esperadas y reportadas por otros autores (Cruz y col. 2001), esto posiblemente se debió a que al no presentar un cuadro febril, el cual era uno de nuestros parámetros más importantes para tomar acciones en el experimento, pudo suceder que se pasara el tiempo óptimo para encontrar el máximo desarrollo de lesiones, lo cual también es sugerido al encontrar resolución en las lesiones pulmonares.

Para el caso del grupo 2, las lesiones pulmonares también nos indicaron que existió resolución de las mismas, lo cual nos evidencia de igual forma que en el grupo 1, que sacrificamos a los animales de manera tardía y por ello no detectamos un mayor porcentaje de lesión pulmonar.

Para el grupo 3, desafiado con *Haemophilus parasuis*, detectamos una mayor cantidad de lesiones pulmonares claramente diferentes de los grupos anteriores, similares a las referidas como sugestivas de la enfermedad cuando está involucrada una cepa con mayor virulencia al aparato respiratorio (Kielstein 1991).

En el caso del grupo 4, desafiado con *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Mycoplasma hyorhinis*, encontramos evidencias similares a la de los grupos 1 y 2, en donde las lesiones pulmonares mostraron resolución, indicándonos esto nuevamente que sacrificamos de manera tardía a los cerdos.

El grupo 5, en donde se desafiaron de manera secuencial *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis* y *Haemophilus parasuis* respectivamente, encontramos lesiones pulmonares de leves a severas, evidenciándose una posible interacción entre los patógenos involucrados, lo cual no fue encontrado desde el punto de vista estadístico.

El grupo 6, el cual tenía a *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Haemophilus parasuis*, secuencialmente desafiados, denotó lesiones pulmonares severas con adherencias pulmonares severas a los diferentes lóbulos pulmonares, así como hidrotórax, dando esto una clara participación de todos los patógenos involucrados en donde principalmente las lesiones encontradas se pueden referir a *Haemophilus parasuis* (Amano y col. 1994).

El grupo 7, desafiado con *Mycoplasma hyorhinis* y *Haemophilus parasuis*, fue el grupo con mayor porcentaje de lesión pulmonar promedio, en donde las lesiones encontradas fueron muy severas con adherencias apicales, cardíacas y diafragmáticas severas, hidrotórax y líquido articular aumentado. En este caso observamos desde el punto de vista anatomopatológico una posible sinergia entre estos agentes, ya que si analizamos las lesiones encontradas en los grupos donde se desafiaron de manera individual tanto *Mycoplasma hyorhinis* como *Haemophilus parasuis*, observamos que en este grupo son mucho mayores a lo encontrado de manera individual. Sin embargo esta situación no pudo ser demostrada estadísticamente. Creemos que es de suma importancia determinar la participación de estos agentes en conjunto en condiciones de campo, para poder valorar el impacto productivo y económico que esta posible sinergia puede estar causando en el campo Mexicano.

El grupo 8, fue el control negativo y no se encontraron lesiones patológicas aparentes macroscópicamente.

En el caso de las lesiones microscópicas encontradas en los diferentes grupos, podemos indicar lo siguiente:

En el grupo 1, desafiado solo con *Mycoplasma hyopneumoniae*, las lesiones encontradas son características de las reportadas por diversos autores (Livingstone 1972; Whittlestone 1972). Cabe señalar que encontramos evidencias de neumonía intersticial, lo que pudiera indicarnos la posible participación de un agente viral no detectado en nuestro diagnóstico inicial de los animales.

El grupo 2, desafiado con *Mycoplasma hyorhinis*, encontramos que las lesiones son compatibles con lo reportado por diferentes autores (Ross 1999), indicando de manera importante que ésta evaluación fue solamente en pulmón.

El grupo 3, desafiado con *Haemophilus parasuis*, mostró lesiones histopatológicas reportadas por varios autores (Vahle y col. 1995).

El grupo 4, donde se desafió con *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Mycoplasma hyorhinis*, las lesiones denotaron nuevamente algunas de las características que producen ambos agentes, así como nuevamente encontramos neumonía intersticial, la cual se puede deber como lo indicamos en el grupo 1 a otro agente viral presente en los cerdos del experimento.

En el grupo 5 las lesiones macroscópicas encontradas, nos indican la clara participación de más de un agente en el tejido pulmonar, en donde observamos la activación del tejido linfóide asociado a bronquiolos (BALT), así como la presencia de macrófagos activados y destrucción de estos mismos.

En el grupo 6, observamos una necrosis focal en hígado con acumulo de mononucleares, lo que no corresponde a las lesiones características de *Mycoplasma hyopneumoniae* y lo *Haemophilus parasuis* esperadas, en donde este tipo de lesiones pueden presentarse en infecciones virales (Lukert y Allan 1999). También encontramos lesiones neumónicas sugestivas de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

En el grupo 7, las lesiones encontradas son más evidentes de la participación de los agentes involucrados en el desafío, en donde ambos son capaces de producir ese tipo de lesiones. Nuevamente encontramos neumonía intersticial, la cual pudo deberse a la participación de un agente viral presente en los cerdos de los grupos (Benfield 1999).

El grupo 8, correspondió al grupo control negativo, como se demostró en los hallazgos microscópicos al no encontrarse lesiones histopatológicas.

En lo referente a las pruebas serológicas se encontró como esperábamos una correspondencia tanto predesafío como posdesafío a los patógenos involucrados en nuestro experimento que podíamos valorar, lo que nos indica una respuesta patógeno específica en cada grupo.

Los reaislamientos de los agentes involucrados fueron positivos y adecuados para cada grupo, según el desafío o desafíos que tuvieron. Con ello pudimos volver a valorar las técnicas y métodos de aislamiento de *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis* y de *Haemophilus parasuis*, en animales que única y exclusivamente tenían estos agentes o bien se encontraban en una combinación entre ellos. Aún y cuando muchos autores (Little 1970; Miniats y col. 1986; Müller y col. 1993) han referido que el aislamiento de *Mycoplasma hyopneumoniae* y de *Haemophilus parasuis*, es difícil, este estudio sugiere que cuando se cuenta con las muestras adecuadas, los medios apropiados, la metodología correcta y la experiencia para hacerlo, los aislamientos se realizan de una manera certera.

En el caso del peso promedio de los animales, hay que considerar que para la formación de los grupos se seleccionaron primeramente por tamaño /peso, para hacer grupos homogéneos y evitar así problemas de socialización, por lo que existieron

diferencias de peso entre los diferentes grupos evaluados de manera inicial. Conforme se desarrollo el experimento el comportamiento de los diferentes grupos fue también similar, en donde el grupo más homogéneo fue el grupo control negativo. Por su parte la ganancia de peso se evaluó semanalmente, en donde se pudo observar que todos los grupos donde existió un desafío con *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis* o con *Haemophilus parasuis* tuvieron una reducción en esta ganancia en las diferentes etapas del experimento, pero no se encontró una diferencia estadística significativa, volviendo a rangos más próximos a la normalidad a la finalización del experimento, situación que no se observó en el grupo 8 o control negativo.

Creemos es de suma importancia recalcar que las evidencias anatomopatológicas en conjunto con las manifestaciones clínicas observadas en el grupo 7, desafiado con *Mycoplasma hyorhinis* y *Haemophilus parasuis*, aún y cuando estadísticamente no encontramos diferencias con los demás grupos, pueden indicar una participación sinérgica entre estos agentes. Por ello es necesario realizar evaluaciones en condiciones de campo para poder determinar el posible impacto productivo y económico de esta combinación de agentes en las granjas porcinas.

6. Bibliografia.

- Aalund, O.; Willeberg, P.; Mandrup, M.; and Riemann, H. P. 1976. Lung lesions at slaughter: Associations to factors in the pig herd. *Nord Vet Med* 28:487-495.
- Adegboye, D.S. 1998. A review of mycoplasma induced immunosupresion. *British Veterinary Journal*. 134:536-556.
- Albina, E.; Leforban, Y.; Baron, T.; Plana Duran, J.; and Vannier, P. 1992. An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Ann Rec Vet* 23:167-176.
- Alexander, T. J. L.; Thornton, K.; Boon, G.; Lysons, R. J.; and Gush, A. F. 1980. Medicated early weaning to obtain pigs free from pathogens endemic in the herd of origin. *Vet Rec* 106:114-119.
- Amanfu, W.; Weng, C.N.; Ross, R.F.; Barnes, H.J. 1984. Diagnosis of mycoplasma pneumonia of swine: Sequential study by direct immunofluorescence. *American Journal Veterinary Research*. 45:1349-1352.
- Amano, H.; Shibata, M.; Kajio, N; and Morozumi, T. 1994. Pathologic observations of pigs intranasally inoculated with serovar 1, 4, and 5 of *Haemophilus parasuis* using immunoperoxidase method. *J Vet Med Sci* 56:639-644.
- Amass, S. F.; Clark, L. K.; Van Alstine, W. G.; Bowersock, T. L.; Murphy, D. A.; Knox, K. E.; and Albregts, S. R. 1994. Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida* infections in swine. *J Am Vet Med Assoc* 204:102-107.
- Andersen, J. B. 1991. National programs to eliminate PRV: Eradication in Denmark. In *Proc 1st Int Symp on Eradication of Pseudorabies (Aujeszky's) Virus*. St. Paul, Minn., pp. 217-223.
- Anderson, P. L.; Morrison, R. B.; Molitor, T. W.; and Thawley, D. G. 1990. Factors associated with circulation of pseudorabies virus within swine herds. *J Am Vet Med Assoc* 196:877-880.
- Armstrong, C. H., and Friis, N. F. 1981. Isolation of *Mycoplasma flocculare* from swine in the United States. *Am J Vet Res* 42:1030-1032.
- Armstrong, C. H.; Freeman, M. J.; Sands-Freeman, L.; Lopez-Osuna, M.; Young, T.; and Runnels, L. J. 1983. Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay and the indirect hemagglutination and complement fixation tests for detecting antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Can J Comp Med* 47:464-470.
- Armstrong, C.H. 1982. Mycoplasmal pneumonia of swine *International Swine Update (Squibb) Issue One* pp. 1, 6 y 8.
- Armstrong, C.H.; Freeman, J.; Sands-Freeman, L.; Lopez-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*. *Canadian Journal Comparative Medicine*. 47:464-470.
- Armstrong, C.H.; Freeman, J.; Sands-Freeman, L.; Lopez-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*. Canadian Journal Comparative Medicine. 47:464-470.
- Artiushin, S., and Minion, F. 1996. Arbitrarily primed PCR analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates demonstrates genetic heterogeneity. Int J Syst Bacteriol 46:324-328.
 - Artiushin, S.; Stipkovits, L.; Minion, F.C. 1993. Development of polymerasa chain reaction primers to detect *Mycoplasma hyopneumoniae*. Molecular Cell Probes. 7:381-385.
 - Awad-Masalmeh, M.; Kafer, J.; and Schuh, M. 1990. On the occurrence of chronic respiratory disease at swine herds in Austria: Bacteriological findings, efficacy of autogenous vaccines. Proc Int Pig Vet Soc 11:107.
 - Bäckström, L. 1978. The relationship between disease incidence of fatteners recorded at slaughter and environmental factors in herds. Nord Vet Med 30:526-533.
 - Bäckström, L., and Bremer, H. 1976. SjukDaomsregistreringarp. Svin vid Slaktbesiktningtt Hjäpmedeli Frebyggande Svinh.lsovard. Svensk Vet Tidn 28:312-336.
 - Bäckström, L.; Bremer, H.; Dyrendahl, I.; and Olsson, H. 1975. Sambandsstudier av produktions- och sjukdomsdatap. slaktsvin i en integreret bes.ttning med h.g frekvens av atrofisk rhinit, enzootisk pneumoni ock pleurit. Svensk Vet Tidn 27:1028-1040.
 - Bäckström, L.; Hoefling, D. C.; and Morkoc, A. C. 1985. Effect of atrophic rhinitis on growth rate in Illinois swine herds. J Am Vet Med Assoc 187:712-715. B%kbo, P.; Kooij, D.; Mortensen, S.; Barfod, K.; and
 - Bakos, K. 1955. Studien über *Haemophilus suis*, mit besondes Berücksichtigung der serologischen Differenzierung sein Stämme, D.V.M. dissertation. University of Stockholm, Stockholm, Sweden. (In German).
 - Baskerville, A. 1981. Mechanisms of infection in the respiratory tract. NZ Vet J 29:235-238.
 - Bechmann, G. 1990. Neutralizing activity against *Pasteurella multocida* toxin in sera of pigs with atrophic rhinitis. Proc Int Pig Vet Soc 11:50.
 - Bendixen, H. C. 1971. Om nysesyge hos svinet. Nord Vet Med (Suppl) 23:1.
 - Benfield D. A., J. E. Collins, S. A. Dee, P. G. Halbur, H. S. Joo, K. M. Lager, W. L. Mengeling, M. P. Murtaugh, K. D. Rossow, G. W. Stevenson, and J. J. Zimmerman, Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome en Viral Diseases, en Diseases of Swine, 8a, edition, Edited by Barbara E. Straw, Sylvie D'Allaire, William L. Mengeling, David J. Taylor, pp 201-232, U. S. A., 1999.
 - Bereiter, M.; Young, T.F.; Joo, H.S.; Ross, R.F. 1990. Evaluation of the ELISA and comparison to the complement fixation test and radial immunodiffusion enzyme assay for detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine serum. Veterinary Microbiology. 25:177-192.
 - Bertram, T. A. 1985. Quantitative morphology of peracute pulmonary lesions in swine induced by *Haemophilus pleuropneumoniae*. Vet Pathol 22:598-609.
 - Bertschinger, H. U.; Keller, H.; Löhner, A.; and Wegmann, W. 1972. Der zeitliche Verlauf der experimentellen enzootischen Pneumonie beim SPF-Schwein. Schweiz Arch Tierheilkd 114:107-118.
 - Betts, A. O. 1952. Respiratory diseases of pigs. V. Some clinical and

- epidemiological aspects of virus pneumonia of pigs. *Vet Rec* 64:283-288.
- Biberstein E.L., Gunnarsson A., Hurvell B., Cultural and Biochemical Criteria for the Identification of *Haemophilus* sp. from swine. *Am. J. Vet. Res.* 38 : 1, 7-11, 1977.
 - Bille, N.; Larsen, J. L.; Svendsen, J.; and Nielsen, N. C. 1975. Prewearing mortality in pigs. 6. Incidence and causes of pneumonia. *Nord Vet Med* 27:482-495.
 - Blanchard, B.; Kobisch, M.; Bov., J. M.; and Saillard, C. 1996. Polymerase chain reaction for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in tracheobronchiolar washings from pigs. *Mol Cell Probes* 10:15-22.
 - Blanchard, B.; Vena, M. M.; Cavalier, A.; Le Lannic, J.; Gouranton, J.; and Kobisch, M. 1992. Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Micro* 30:329-341.
 - Blowey, R. W. 1993. *Mycoplasma hyosynoviae* arthritis. *Pig Vet J* 30:72-76.
 - Boessen, C. R.; Kliebenstein, J. B.; Cowart, R. P.; Moore, K. C.; and Brurbee, C. R. 1988. Effective use of slaughter checks to determine economic loss from morbidity in swine. *Proc 5th Int Symp Vet Epidemiol Econ, Acta Vet Scand (Suppl)* 84:436-438.
 - Boh Ch. And Sheryl C., A " Fuzzy " ELISA for serotyping *Haemophilus parasuis* Using Heat - Stable Antigen Extracts. *Proc. 13th Int. Pig Vet. Soc.Congr. Bangkok, Thailand, 1994.*
 - Bommeli, W. R., and Nicolet, J. 1983. A method for the evaluation of enzyme linked immunoassay results for diagnosing enzootic pneumonia in pig herds. *Proc Int Symp World Assoc Vet Lab Diag* 3(2):439-442.
 - Bommeli, W.R.; Nicolet, J. 1983. A method for the evaluation of enzyme linked immunoassay results for diagnosing enzootic pneumonia in pig herds. *Proceeding International Symposium World Association Veterinary Laboratory Diagnostic.* 3(2): 439-442.
 - Bosch, H. 1994. *Actinobacillus pleuropneumoniae* in swine: Pathogenesis, antigens and vaccination. In *Proc Haemophilus, Actinobacillus and Pasteurella Int Conf. Edinburgh, Scotland.*
 - Boughton, E.; Thoms, C. 1976. *Mycoplasma Laboratory Handbook*; Ministry of agriculture, Fisheries and Food; Central Veterinary Laboratory; New Haw, Weybridge, Surrey, England. pp. 26-39.
 - Brooks, E.; Faulds, D. 1989. The *Mycoplasma hyopneumoniae* 74.5-kDa antigen elicits neutralizing antibodies and shares sequence similarity with heat-shock proteins. *Vaccines.* 89:265-269.
 - Bröring, S.; Møller, E.; Petzoldt, K.; Schoon, H. A.; and Bergmann, K. C. 1989. Das Zusammenwirken von *Actinobacillus pleuropneumoniae* und influenza A-virus bei experimentell infizierten M.usen. *J Vet Med (B)* 36:681-690.
 - Bruggmann, S.; Engberg, B.; and Ehrensperger, F. 1977. Demonstration of *M. suis pneumoniae* in pig lungs by the enzyme-linked immunoperoxidase technique. *Vet Rec.*101: 137.
 - Burch, D. 1982. The influence of housing design and some management systems on the health of the growing pig, particularly in relation to pneumonia. *Pig News and Information.* 5 (4): 343-349.
 - Burch, D. G. S. 1984a. The evaluation of tiamulin by injection for the treatment of

- enzootic pneumonia and mycoplasmal arthritis of pigs. Proc Int Congr Pig Vet Soc 8:117.
- Burch, D. G. S.; Jones, G. T.; Heard, T. W.; and Tuck, R. E. 1986. The synergistic activity of tiamulin and chlortetracycline: In feed treatment of bacterially complicated enzootic pneumonia in fattening pigs. Vet Rec 119:108-112.
 - Burch, D. G. S.; Jones, G. T.; Heard, T. W.; and Tuck, R. E. 1986. The synergistic activity of tiamulin and chlortetracycline: In feed treatment of bacterially complicated enzootic pneumonia in fattening pigs. Vet Rec 119:108-112.
 - Buttenschøn, J. 1989. Differentiation between five types of pneumonia distribution pattern in pigs. J Vet Med (A) 36:494-504.
 - Buttenschøn, J.; Svensmark, B.; and Kyrval, J. 1995. Non-purulent arthritis in Danish slaughter pigs. I. A study of field cases. J Vet Med A 42:633-641.
 - Böttner, A. 1997. Diagnosis of PRRS. Vet Microbiol 55:295-301.
 - Böttner, A. 1997. Diagnosis of PRRS. Vet Microbiol 55:295-301.
 - Calsamiglia, M. 1999. Development and application of molecular diagnostic techniques for *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Haemophilus parasuis*. Ph.D. Thesis. University of Minnesota.
 - Calsamiglia, M.; Pijoan, C.; Trigo, A. 1999 Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. Journal Veterinary Diagnostic Investigation. 11:246-251.
 - Canadian Journal of Veterinary Research, Proceedings of the international conference on the *Haemophilus-Actinobacillus-Pasteurella*, 54: Supplement, 1990.
 - Caron, J.; Ouardani, M.; Dea, S. 2000. Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes. Journal Clinic Microbiology. 38(4): 1390-1396.
 - Caruso, J. P., and Jeska, E. L. 1990. Phagocytic functions of pulmonary alveolar macrophages in genetically selected lean and obese swine and effects of exogenous linolenic acid upon cell function. Vet Immunol Immunopathol 24:27-36.
 - Caruso, J. P., and Jeska, E. L. 1990. Phagocytic functions of pulmonary alveolar macrophages in genetically selected lean and obese swine and effects of exogenous linolenic acid upon cell function. Vet Immunol Immunopathol 24:27-36.
 - Caruso, J., and Ross, R. F. 1990. Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infections on alveolar macrophage functions in swine. Am J Vet Res 51:227-231.
 - Castryck, F.; Devriese, L. A.; Hommez, J.; Cassimon, P.; and Miry, C. 1990. Bacterial agents associated with respiratory disease in young feeder pigs. Proc Int Pig Vet Soc 11:112.
 - Chen, J. R.; Lin, C. S.; and Weng, C. N. 1996. An adhesin of P114 from *Mycoplasma hyopneumoniae*. Proc 11th Int Congr Int Org Mycoplasmol 4:131.
 - Christensen, G. 1981. Pleuropneumoni hos svin fremkaldt af *Haemophilus pleuropneumoniae*. II. Undersøgelser vedrørende epidemiologi samt relation til

- kronisk pleuritis (brysthindear) hos slagtesvin. [Pleuropneumonia in swine due to *Haemophilus pleuropneumoniae*. II. Studies on the epidemiology and the relation to chronic pleuritis (pleural scars) in baconers]. Nord Vet Med 33:236-249.
- Christensen, G., and Mousing, J. 1994. Udvidet slagtedyrsdiagnostik (USK) p. plucks fra svin. II. Daglig tilvækst i relation til forekomst af sygdomsforandringer i pluckset p. slagtetidspunktet [Extended postmortem examination on plucks from slaughter pigs. II. Daily weight gain in relation to lesions in the plucks at slaughter]. Dansk Vet Tidsskr 77:753-763.
 - Christensen, G., and Mousing, J. 1994. Udvidet slagtedyrsdiagnostik (USK) p. plucks fra svin. II. relation til forekomst af sygdomsforandringer i pluckset p. slagtetidspunktet [Extended postmortem examination on plucks from slaughter pigs. II. Daily weight gain in relation to lesions in the plucks at slaughter]. Dansk Vet Tidsskr 77:753-763.
 - Christopher-Hennings, J.; Nelson, E. A.; Nelson, J. K.; Hines, R. J.; Swenson, S. L.; Hill, H. T.; Zimmerman, J. J.; Katz, J. B.; Yaeger, M. J.; Christopher, C. L. C.; and Benfield, D. A. 1995. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR. J Clin Microbiol 33:1730-1734.
 - Ciprián, A.; Cruz, T.; Pijoan, C. 1982 Specific fluorescence against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pneumonic lungs of pig in México. Proceeding International Pig Veterinary Society Congress 1982, México, p. 90.
 - Ciprián, A.; Palacios, J.M.; Cruz, S.T.; Romero, R.A.; Colmenares, V.G. 2001. Efecto clínico de la combinación florfenicol-tilosina adicionada en alimento en lechones inoculados experimentalmente con una cepa de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Memorias del XXXVI Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, A.C. Querétaro, Qro. p. 52.
 - Ciprián, A.; Pijoan, C.; Cruz, T.; Camacho, J.; Tórtora, J.; Colmenares, G.; López-Revilla, R.; Garza de la, M. 1988. *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. Canadian Journal Veterinary Research. 52:434-438.
 - Ciprián, C. A. 1979. Aislamiento y caracterización de micoplasmas a partir de pulmones neumónicos de ovinos y caprinos de México. Tesis de Maestría. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Cuautitlán, UNAM. pp. 40-55.
 - Ciprián, C. A. 1987. Interacción entre *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Pasteurella multocida* en las neumonías de los cerdos. Tesis Doctoral. FESC UNAM. pp. 22-34.
 - Clark, L. K.; Armstrong, C. H.; Scheit, A. B.; and Van Alstine, W. G. 1993. The effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection on growth in pigs with or without environmental constraints. Swine Health Prod 1:10-14.
 - Clark, L. K.; Hill, M. A.; Kniffen, T. S.; VanAlstine, W.; Stevenson, G.; Meyer, K. B.; Wu, C. C.; Scheidt, A. B.; Knox, K.; and Albrechts, S. 1994. An evaluation of the components of medicated early weaning. Sw Hlth Prod 2:5-11.
 - Clark, L. K.; Scheidt, A. B.; Mayrose V. B.; Armstrong, C. H.; and Knox, K. 1990. Prevention of the development of enzootic pneumonia within an infected swine herd. Proc
 - Clark, L. K.; Scheidt, A. B.; Mayrose, V. B.; Armstrong, C. H.; Cline, T. R.; and Knox, K. 1989. Methodology to reduce days to market in swine herds with enzootic pneumonia. Proc Iowa Vet Med Assoc 107:129-135.

- Collins, M. T.; Bäckström, L. R.; and Brim, T. A. 1989. Turbinate perimeter ratio as an indicator of conchal atrophy for diagnosis of atrophic rhinitis in pigs. *Am J Vet Res* 50:421-424.
- Cooper, A. C.; Fuller, J. R.; Fuller, M. K.; Whittlestone, P.; and Wise, D. R. 1993. In vitro activity of danofloxacin, tylosin and oxytetracycline against mycoplasmas of veterinary importance. *Res Vet Sci* 54:329-334.
- Cowart, R. P.; Lipsey, R. J.; and Hedrick, H. B. 1990. Measurements of conchal atrophy and their association with growth rate in commingled feeder pigs. *J Am Vet Med Assoc* 196:1262-1264.
- Cruz, S.T.A.; Mendoza, E.S.; Perez, V.; Oliva, M.D.; Mendoza, M.; González, N.G.; Romero, R.A.; Sotres, C.F.; Colmenares, V.G.; Ciprián, C.A. 2001. Preparación de un cultivo primario de pulmón irradiado con u/uv para la propagación de *Mycoplasma hyopneumoniae* para desafío. Memorias del XXXVI Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, A.C. Querétaro, Qro. p. 57.
- Curtis, S. E.; Anderson, C. R.; Simon, J.; Jensen, A. H.; Day, D. L.; and Kelley, K. W. 1975a. Effects of aerial ammonia, hydrogen sulfide and swine-house dust on rate of gain and respiratory tract structure in swine. *J Anim Sci* 41:735-739.
- Curtis, S. E.; Drummond, J. G.; Grunloh, D. J.; Brendan Lynch, P.; and Jensen, A. H. 1975b. Relative and qualitative aspects of aerial bacteria and dust in swine houses. *J Anim Sci* 41:1512-1521.
- Curtis, S.E. 1981. Environmental management in animal agriculture. *Animal Environment Services, Mahomet, Illinois*. pp 21-24.
- Curtis, S.E.; Anderson, C.R.; Simon, J.; Hensen, A.H.; Day, D.L.; Kelley, K.W. 1975. Effect of serial NH, HS and swine dust of rate of gain and respiratory tract structure in swine, *Journal of Animal Science*. 41(3): 735-739.
- D'Allaire, S.; Bigras-Poulin, M.; Paradis, M. A.; and Martineau, G.-P. 1988. Evaluation of atrophic rhinitis: Are the results repeatable? *Proc Int Pig Vet Soc* 10:38.
- Dayalu, K. I.; Keich, R. L.; Charlier, P.; and Martinod, S. 1992. Evaluation of the beneficial effects of a *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine (Respisure): Results from controlled and field studies. *Proc Int Pig Vet Soc* 12:302.
- Dayalu, K. I. 1994. Beneficial effects of a *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine (RespisureTM, Stellamune MycoplasmaTM) as evaluated under both experimental and field conditions. *Proc Int Congr Pig Vet Soc* 13:137.
- Dayalu, K.I.; Ross, R.F. 1990. Evaluation of experimental vaccines for control of porcine pneumonia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Proceeding International Pig Veterinary Society Congress* 11. p 83.
- Debey, M.C.; Ross, R.F. 1994. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infection and Immunity*. 62 (12):5312-5318.
- Dee, S. A. 1994. Apparent prevention of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in growing pigs with a low-cost modified medicated-early-weaning program. *Sw Hlth Prod* 2:7-12.
- Dee, S. A.; Joo, H. S.; Polson, D. D.; Marsh, W. E.; and Pijoan, C. 1996. An evaluation of nursery depopulation as a strategy for controlling post-weaning PRRS: A summary of 34 farms. *Proc Int Pig Vet Soc* 14:68.

- Dee, S.A. 1996. The porcine respiratory disease complex: are subpopulations important. *Swine Health Production* 4:147-149.
- Dee, S.A.; Philips, R.E. 1997. Use of polymerase chain (PCR) to detect vertical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv) in piglets from gilt litters. *Swine Health Production*. 7(5):237-239.
- Desrosiers, R. 1986. Therapeutic control and economic aspects of porcine pleuropneumonia in finishing pigs. *Vet Rec* 119:89-90.
- Dial, G. D.; Wiseman, B. S.; Davies, P. R.; Marsh, W. E.; Molitor, T. W.; Morrison, R. B.; and Thawley, D. G. 1992. Strategies employed in the United States for improving the health of swine. *Proc Minn Sw Conf Vet* 19:1-26.
- Dijk, W. P. J. van; Klaver, J.; and Verstegen, M. W. A. 1984. Frequentie van enkele aandoeningen bij slachtvarkens en de effecten op groei en slachtkwaliteit. *Tijdschr Diergeneeskd* 109:539-548.
- Done, S. H. 1988. Some aspects of respiratory defense with special reference to immunity. *Pig Vet Soc Proc* 20:31-60.
- Donham, K. J. 1991. Association of environmental air contaminants with disease and productivity in swine. *Am J Vet Res* 52:1723-1730.
- Donham, K. J.; Scallon, L. J.; Pendorph, W.; Treuhaft, M. W.; and Roberts, R. C. 1986. Characterization of dust collected from swine confinement buildings. *Am Ind Hyg Assoc J* 47:404-410.
- Dritz, S. S.; Chengappa, M. M.; Nelssen, J. L.; Tokach, M. D.; Goodband, R. D.; Nietfeld, J. C.; and Staats, J. J. 1996. Growth and microbial flora of nonmedicated, segregated, early weaned pigs from a commercial swine operation. *J Am Vet Med Assoc* 208:711-715.
- Dritz, S. S.; Chengappa, M. M.; Nelssen, J. L.; Tokach, M. D.; Goodband, R. D.; Nietfeld, J. C.; and Staats, J. J. 1996. Growth and microbial flora of nonmedicated segregated, early weaned pigs from a commercial swine operation. *J Am Vet Med Assoc* 208:711-715.
- Drummond, J.G.; Curtis, S.E.; Simon, J.; Norton, N.W. 1980. The influence of housing design and some management systems on the health of the growing pig, particularly in relation to pneumonia. *Pig News and Information*. 5(4): 343-349.
- Dumas, G.; Denicourt, M.; D'Allaire, S.; Bigras-Poulin, M.; and Martineau, G.-P. 1990. Atrophic rhinitis and growth rate: A potential confounding effect related to slaughter weight. *Proc Int Pig Vet Soc* 11:385.
- Dungworth, D. L. 1993. The respiratory system. In *Pathology of Domestic Animals*. Vol. 2. 4th ed. Ed. K. V. F. Jubb, P. C. Kennedy, and N. Palmer. San Diego: Academic Press, p. 592.
- Erickson, B. Z.; Ross, R. F.; and Bove, J. M. 1988. Isolation of *Mycoplasma savarium* from swine. *Vet Microbiol* 16:385-390.
- Etheridge J.R.; Cottew G.S.; Lloyd L.C. 1979. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from lesions on experimentally infected pigs. *Australian Veterinary Journal*. 55:356-359
- Etheridge, J. R.; Cottew, G. S.; and Lloyd, L. C. 1979. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from lesions in experimentally infected pigs. *Aust Vet J* 55:356-359.
- Falk, K.; Lium, B. M.; and Degaard. 1990. Occurrence of lung lesions and antibodies to serotypes 2 and 6 of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and to

- Haemophilus parasuis* in 5176 slaughter weight pigs from 113 elite herds in Norway. Proc Int Pig Vet Soc 11:31.
- Farrington, D. O. 1976. Immunization of swine against mycoplasmal pneumonia. Proc Int Congr Pig Vet Soc 4:4. Feld, N. C.; Qvist, P.; Ahrens, P.; Friis, N. F.; and Meyling, A. 1992. A monoclonal blocking ELISA detecting serum antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet Microbiol 30:35-46.
 - Feenstra, A. 1985. Effects of air temperatures on weaned piglets. Pig News Inf 6:295-299.
 - Feld, N.C.; Qvits, P.; Ahrens, P.; Friis, N.F.; Meyling, A. 1992. A monoclonal blocking ELISA detecting serum antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. Veterinary Microbiology. 30:35-46.
 - Flesja, K. I., and Solberg, I. 1981. Pathological lesions in swine at slaughter. Acta Vet Scand 22:272-282.
 - Flesja, K. I.; Forus, I. B.; and Solberg, I. 1982. Pathological lesions in swine at slaughter. V. Pathological lesions in relation to some environmental factors in the herds. Acta Vet Scand 23:169-183.
 - Flori, J.; Mousing, J.; Gardner, I. A.; Willeberg, P.; and Have, P. 1995. Risk factors associated with seropositivity to porcine respiratory coronavirus in Danish swine herds. Prev Vet Med 25:51-62.
 - Foged, N. T.; Nielsen, J. P.; and Barfod, K. 1990. The use of ELISA-determination of *Pasteurella multocida* toxin antibodies in the control of progressive atrophic rhinitis. Proc Int Pig Vet Soc 11:49.
 - Foged, N. T.; Pedersen, K. B.; and Elling, F. 1987. Characterization and biological effects of the *Pasteurella multocida* toxin. FEMS Microbiol Lett 43:45-51.
 - Folkesson, H. G.; Weststrom, B. R.; Pierzynowski, S. G.; Svendsen, J.; Lundin, S.; and Karlsson, B. W. 1990. Lung permeability to different-sized macromolecules in developing pigs. Proc Int Pig Vet Soc 11:430.
 - Frey, J. 1995. Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. Trends Microbio 3:257.
 - Frey, J.; Haldimann, A.; Kobisch, M.; Nicolet, J. (1994). Immune response against the L-lactate dehydrogenase of *Mycoplasma hyopneumoniae* in enzootic pneumonia of swine. Microbial Pathogenesis. 17:313-322.
 - Friis N. F. 1975. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis pneumoniae* and *Mycoplasma flocculare*. Nord Vet Med 27:337-339.
 - Friis N.F. 1971b. A selective medium for *Mycoplasma suis pneumoniae*. Acta Veterinaria Scandinavica. 12:454-456
 - Friis N.F. 1973. Resistance of porcine mycoplasmas to drying. Acta Veterinaria Scandinavica. 14:489-491.
 - Friis N.F. 1975. The SPS and Digitonina test applied to porcine mycoplasmas. Acta Veterinaria Scandinavica. 16:474-476.
 - Friis, N.F. 1971a. Mycoplasmas cultivated from the respiratory tract of Danish pigs. Acta Veterinaria Scandinavica 12:116-119.
 - Friis, N. F. 1969. *Mycoplasma suis pneumoniae* isolated in Denmark. Acta Veterinaria Scandinavica. 10:295-297
 - Friis, N. F. 1973. The pathogenicity of *Mycoplasma flocculare*. Acta Vet Scand

14:344-346.

- Friis, N. F. 1974. *Mycoplasma suis pneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* in comparative pathogenicity studies. *Acta Vet Scand* 15:507-518.
- Friis, N. F.; Larsen, H.; and Ahrens, P. 1990. Propagation of *Mycoplasma hyosynoviae* in the presence of specific suppressing factors against *Mycoplasma hyorhinis*. *IOM Lett* 1:377-378.
- Friis. 1976. A serologic variant of *Mycoplasma hyorhinis* recovered from the conjunctiva of swine. *Acta Vet Scand* 17:343-353.
- Futo, S.; Seto, Y.; Okada, M.; Sato, S.; Suzuki, T.; Kawai, K.; Imada, Y.; Mori, Y. 1995. Recombinant 46-kilodalton surface antigen (P46) of *Mycoplasma hyopneumoniae* expressed in *Escherichia coli* can be used for early specific diagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal Clinical Microbiology*. 33(3): 680-683.
- Gabridge, M.G.; Brighth, M.J.; Richards, H.N. 1982. Scanning electron microscopy of *Mycoplasma hyopneumoniae* on the membrane of individual ciliated tracheal cells. *In Vitro*. 1:55-62.
- Ganter, M.; Kipper, S.; and Hensel, A. 1990. Bronchoscopy and bronchoalveolar lavage of live anaesthetized pigs. *Proc Int Pig Vet Soc* 11:109.
- Gatlin, C. L.; Jordan, W. H.; Shryock, T. R.; and Smith, W. C. 1996. The quantitation of turbinate atrophy in pigs to measure the severity of induced atrophic rhinitis. *Can J Vet Res* 60:121-126.
- Geary, S.; Walczak, E.M. 1985b. Isolation of a cytophatic factor from *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Infection and Immunity*. 48:576-578
- Geary, S.J.; Walczak, E.M. 1985a. Cytophatic of whole cells and purified membranes of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Infection and Immunity*. 41:132-136
- Giger, T., Bruggman, S., Nicolet J 1977. Immunological methods for the detection of
- Gilmour, M. I. 1989. Airborne pollution and respiratory disease in animal houses. *Dis Abstr Int (B)* 49:2521.
- Gloster, J.; Blackall, R. M.; Sellers, R. F.; and Donaldson, A. I. 1981. Forecasting the airborne spread of foot-and mouth disease. *Vet Rec* 108:370-374.
- Gois, M., and Kuksa, F. 1974. Intranasal infection of gnotobiotic piglets with *Mycoplasma hyorhinis*: Differences in virulence of the strains and influence of age on the development of infection. *Zentralbl Veterinarmed (B)* 21:352-361.
- González, R.N.; Cruz, S.T.; Mendoza, E.S.; Hernández-Baumgarten, E.; Colmenares, V.G.; Romero, R.A.; Tórtora, P.J.; Ciprián, C.A. 1999. Evidencia por microscopía electrónica de barrido del daño al epitelio mucociliar producido por la interacción entre *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Pasteurella multocida* en el pulmón del cerdo. *Técnica Pecuaria en México* 37(3):31-42.
- Goodwin, R. F. W. 1972a. Isolation of *Mycoplasma suis pneumoniae* from the nasal cavities and lungs of pigs affected with enzootic pneumonia or exposed to this infection. *Res Vet Sci* 13:262-267.
- Goodwin, R. F. W. 1985. Apparent reinfection of enzootic pneumonia-free pig herds: Search for possible causes. *Vet Rec* 116:690-694.
- Goodwin, R. F. W., and Whittlestone, P. 1967. The detection of enzootic pneumonia in pig herds. I. Eight years general experience with a pilot control

- scheme. *Vet Rec* 181:643-647.
- Goodwin, R. F. W.; Chanter, N.; and Rutter, J. M. 1990. Detection and distribution of toxigenic *Pasteurella multocida* in pig herds with different degrees of atrophic rhinitis. *Vet Rec* 126:452-456.
 - Goodwin, R. F. W.; Pomeroy, A. P.; and Whittlestone, P. 1965. Production of enzootic pneumonia in pigs with a mycoplasma. *Vet Rec* 77:1247-1249.
 - Goodwin, R.F.W. 1971. The influences of housing design and some management systems on the health of the growing pig, particularly in relation to pneumonia. *Pig News and Information*. 5(4); 343-349.
 - Goodwin, R.F.W. 1972. Isolation of *Mycoplasma suis pneumoniae* from the nasal cavities and lungs of pigs affected with enzootic pneumonia or exposed to this infection. *Research Veterinary Science*. 13;(3): 262-267.
 - Goodwin, R.F.W.; Pomeroy, A.P.; Whittlestone, P. 1967. Characterization of *Mycoplasma suis pneumoniae*: a mycoplasma causing enzootic pneumoniae of pigs. *Journal Hygiene Cambridge*. 65:85-97.
 - Goodwin, R.F.W.; Pomeroy, A.P.; Whittlestone, P. 1967. Characterization of *Mycoplasma suis pneumoniae*: a mycoplasma causing enzootic pneumoniae of pigs. *Journal Hygiene Cambridge*. 65:85-97.
 - Goodwin, R.F.W.; Whittlestone, P. 1973. Enzootic pneumonia of pigs: Immunization attempts inoculating *Mycoplasma suis pneumoniae* antigen by various routes and with different adjuvants. *British Veterinary*. 129:456-464.
 - Goodwin. 1972b. Experiments on the transmissibility of enzootic pneumonia of pigs. *Res Vet Sci* 13:257-261.
 - Goodwin. 1973. Enzootic pneumonia of pigs: Immunization attempts inoculating *Mycoplasma suis pneumoniae* antigen by various routes and with different adjuvants. *Br Vet J* 129:456-464.
 - Goodwin. 1985. Apparent reinfection of enzootic pneumonia-free pig herds: Search for possible causes. *Vet Rec* 116:690-694.
 - Goovaerts, K.; Jansegers, L.; and Lens, S. 1986. The effect of the water-consumption of fattening pigs. *Proc Int Pig Vet Soc* 9:283.
 - Gorcyca, D.; Schlesinger, K.; Chladek, D.; and Behan, W. 1995. RespPRRS: A new tool for the prevention and control of PRRS in pigs. *Proc Am Assoc Swine Pract*, pp. 1-22.
 - Gradil, C.; Dubuc, C.; and Eaglesome, M. D. 1996. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Seminal transmission. *Vet Rec* 138:521-522.
 - Gram, T.; Ahrens, P.; and Nielsen, J. P. 1996. Evaluation of a PCR for detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mixed bacterial cultures from tonsils. *Vet Microbiol* 51:95-104.
 - Gram, T.; Jacobsen, M. J.; Ahrens, P.; and Nielsen, J. P. 1994. Evaluation of a PCR detection system of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mixed culture from the respiratory tract of pigs. In *Proc Int Haemophilus, Actinobacillus and Pasteurella Int Conf*. Edinburgh, Scotland, p. 50.
 - Guerrero, R. J. 1990. Respiratory disease: An important global problem in the swine industry. *Proc Int Congr Pig Vet Soc* 11:98.
 - Gustafsson, G. 1989. Mass balances of dust in houses for pigs. In *Agricultural Engineering. Proc 11th Int Congr Agric Eng (CIGR)*, Dublin, Eire, 4-8 Sept 1989. Ed. V. A. Dod and P. M. Grace, pp. 1465-1470.

- Haesebrouck, F., and Pensaert, M. B. 1986. Effect of intratracheal challenge of fattening pigs previously immunized with an inactivated influenza H1N1 vaccine. *Vet Microbiol* 11:239-249.
- Halbur, P. G. 1996. Changing trends in the porcine respiratory disease complex. In Proc 96 Pork Summit, Tempe, Ariz, 2-5 May, pp. 76-80.
- Halbur, P. G.; Paul, P. S.; and Janke, B. H. 1993. Viral contributors to the porcine respiratory disease complex. *Proc Am Assoc Sw Pract* 24:343-350.
- Haldimann, A.; Nicolet, J.; Frey, J. (1993). DNA sequence determination and biochemical analysis of the immunogenic protein p36, the lactate dehydrogenase (LDH) of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal General Microbiology*. 139:317-323.
- Hannan, P. C. T., and Goodwin, R. F. W. 1990. Efficacies of norfloxacin and its 6-chloro analogue in experimentally induced *M. hyopneumoniae* pneumonia in pigs. *IOM Lett* 1(8): 351-352.
- Hannan, P. C. T., and Ripley, P. H. 1996. In vitro development of resistance in *Mycoplasma hyopneumoniae* to SDZ PMD 296, tiamulin and two other antimicrobial agents. *Proc Int Congr Pig Vet Soc* 14:225.
- Hannan, P. C. T.; O'Hanlon, P. J.; and Rogers, N. H. 1989. In vitro evaluation of various quinolone antibacterial agents against veterinary mycoplasmas and porcine respiratory bacterial pathogens. *Res Vet Sci* 46:202- 211.
- Hannan, P.T.C.; Banks, R.M.; Bhogal, B.S.; Blanchflower, S.E.; Donald, A.C.; Fish, J. P.; Smith, D. 1984. Reproducible pneumonia in gnotobiotic piglets induced with broth cultures of *Mycoplasma hyopneumoniae* and the effect of animal passage on virulence; *Research Veterinary Science*. 36:153-163.
- Harris, D. L. 1990. The use of Isowean 3 site production to upgrade health status. *Proc Int Congr Pig Vet Soc* 11:374.
- Harris, D. L.; Edgerton, S. L.; and Wilson, E. R. 1990. Large thymus glands in Isowean pigs. *Proc Int Congr Pig Vet Soc* 11:291.
- Hartley, P. E.; Wilesmith, J. W.; and Bradley, R. 1988. The influence of pleural lesions in the pig at slaughter on the duration of the fattening period: An on-farm study. *Vet Rec* 123:208.
- Hartley, P. E.; Wilesmith, J. W.; and Bradley, R. 1988. The influence of pleural lesions in the pig at slaughter on the duration of the fattening period: An on-farm study. *Vet Rec* 123:208.
- Hartmann L., Schröder W., Lübke A. isolation of the major Outer-membrane protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Haemophilus parasuis*. *J. Vet. Med B*. 42: 59-63, 1995.
- Hayek, M. G.; Mitchell, G. E., Jr, Harmon, R. J.; Stahty, T. S.; Cromwell, G. L.; Tucker, R. E.; and Barker, K. B. 1989. Porcine immunoglobulin transfer after prepartum treatment with selenium or vitamin E. *J Anim Sci* 67:1299-1306.
- Heilmann, P.; Möller, G.; and Finsterbusch, L. 1988. Lobre Deposition radioaktiv markierter *Pasteurella multocida* Aerosole in den Lungen von Ferkeln und K.ibern. *Arch Exper Vet Med* 42:490-501.
- Heilmann, P.; Möller, G.; and Finsterbusch, L. 1988. Lob.re Deposition radioaktiv markierter *Pasteurella multocida* Aerosole in den Lungen von Ferkeln und K.ibern. *Arch Exper Vet Med* 42:490-501.
- Hennessy, K. J.; Landolo, J. J.; and Fenwick, B. W. 1993. Serotype identification

of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by arbitrarily primed polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 31:1155-1159.

- Henningsen, D.; Mousing, J.; and Aalund, O. 1988. Porcine corona virus (PCV) i Danmark. En epidemiologisk
- Higushi, R.; Fockler, C.; Dollinger, G.; Watson, R. 1993. Kinetic PCR analysis: real time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology. 11:1026-1030.
- Hodges, R.T.; Bett, A.O.; Jennings, A.R. 1969. Production of pneumonia in gnotobiotic pigs with pure cultures of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Veterinary Record. 84:268-273.
- Holmgren N., Polyarthritits in piglets caused by iron dextran. Proc. 14th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Bologna, Italy, 1996.
- Holmgren, N. 1974. Swine enzootic pneumonia: Immunologic studies in infected sow herds. Res Vet Sci 17:145-153.
- Houben, S.; Callebaut, P.; and Pensaert, M. B. 1995. Comparative study of a blocking enzyme-linked-immunosorbent- assay and the immunoperoxidase monolayer assay for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs. J Virol Method 51:125-128.
- Hoy, S.; Mehlhorn, G.; and Liesckhe, B. 1987. Zur .konomische Bedeutung von Atemwegskrankungen der Schweine. [The economic importance of respiratory diseases of pigs.] Tierzucht 41:334-336.
- Hoy, S.; Mehlhorn, G.; Eulenberger, K.-H.; Erwerth, W.; Johannsen, U.; Dom, W.; and Horogel, K. 1985. Zum Einfluss entz.ndlicher Lungenver.nderungen auf ausgew. Parameter der Schlachtleistung beim Schwein. Monatsh Veterinaermed 40:584-587.
- Hsu, T.; Minion, F.C. 1998. Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* p97 adhesin. Infection and Immunity. 66(10):4762-4766.
- Huhn, R. G. 1971. The action of certain antibiotics and ether on swine enzootic pneumonia. Can J Comp Med 35:1-4.
- Hunneman, W. A. 1983. Vorkomen, ekonomische betekenis en bestrijding van *Haemophilus pleuropneumoniae*-infektes bij varkens. Ph.D. diss., Government Univ of Utrecht, Netherlands.
- Iglesias, G.; Pijoan, C.; Hernández, E. 1982. Characterization of a substance in tracheal exudates with activity against *Pasteurella multocida*. Proceedings International Pig Veterinary Society Congress. México, p.86.
- Inamoto, T.; Takahashi, H.; Yamamoto, K.; Nakai, Y.; and Ogimoto, K. 1994. Antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolated from swine. J Vet Med Sci 56:393-394.
- Jansen, A., and Feddes, J. J. R. 1995. Effect of airborne dust on health and performance of growing pigs. Can Agric Eng 37:211-216.
- Johannsen, U.; Erwerth, W.; Menger, S.; Neumann, R.; Mehlhorn, G.; and Schimmel, D. 1987. Experimentelle Untersuchung zur Wirkung einer chronischen aerogenen Schadgasbelastung des Saugferkels mit Ammoniak unterschiedlicher Konzentrationen. J Vet Med (B) 34:260-273.
- Johnson, R. J.; Maplesden, D. C.; and Szanto, J. 1978. Efficacy of tiamulin in the treatment of mycoplasmal pneumonia of swine. Proc Int Congr Pig Vet Soc

5:M.25.

- Jørgensen, B. 1988. Epidemiologiske analyser af sygdomsdata fra svineavlens forsøgsstationer. II. Dansk Vet Tidsskr 71:9-23.
- Jorsal, S. E., and Thomsen, B. L. 1988. A Cox regression analysis of risk factors related to *Mycoplasma suis* pneumoniae reinfection in Danish SPF-herds. Acta Vet Scand (Suppl) 84:436-437.
- Jørgensen, B. 1988. Epidemiologiske analyser af sygdomsdata fra svineavlens forsøgsstationer. II. Dansk Vet
- Kamp, E.; Bokken, G.; Vermeulen, T.; de Jong, M.; Buys, H.; Reek, F.; and Smits, M. 1994. Large scale use of PCR for the detection of toxigenic *Pasteurella multocida* in nasal and tonsillar swabs of pigs. In Proc *Haemophilus, Actinobacillus* and *Pasteurella* Int Conf. Edinburgh, Scotland, p. 36.
- Kastner P., and Mehlhorn, G. 1989. Untersuchungen zur Deposition und Clearance inhalierter Bakterien (*Staphylococcus aureus*) in der Lunge von Ferkeln. Arch Exper Vet Med 43:379-389.
- Keller, H. 1988. The Swiss health service (PHS). Proc Int Pig Vet Soc 10:334.
- Kelley, K. W. 1980. Stress and immune function: A bibliographic review. Ann Vet Res 11:445-478.
- Kielstein, P. 1991. Zur Glässerschen Krankheit des Schwein Untersuchungen über Zusammenhänge zwischen serologisch Eigenschaften, Kapselausbildung und Virulenz von *Haemophilus parasuis*-Stämmen. Monatsh. Veterinaermed. 46 :137-140. (In German).
- Kielstein, P., and Rapp-Gabrielson, V.J.: Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion Using Heat-Stable Antigen Extracts. J. Clin. Microb. 30 : 862-865, 1992.
- Kim, M.F.; Heidari, M.B.; Stull, S.J.; McIntosh, M.A.; Wise, K.S. 1990. Identification and mapping of an immunogenic region of *Mycoplasma hyopneumoniae* p65 surface lipoprotein expressed in *Escherichia coli* from a cloned genomic fragment. Infection and Immunity. 58:2637-2643.
- Kishima, M.; Ross R.F. 1985. Suppressive effect of nonviable *Mycoplasma hyopneumoniae* of phytohaemagglutinin induced transformation of swine lymphocytes. American Veterinary Research. 46:2366- 2368
- Klausen, J.; Andresen, L. O.; Heegaard, P.; Nielsen, J. P.; and Nielsen, R. 1996. Evaluation of blocking ELISA's for sero diagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 infections based on monoclonal antibodies against capsular polysaccharides and Lps as well as swine-mouse heterohybridoma-derived monoclonal antibodies. In Proc *Haemophilus, Actinobacillus* and *Pasteurella* Int Conf. Acapulco, Mexico, p. 40.
- Kliebenstein, J. B.; Kirtley, C. L.; and Selby, L. A. 1982/83. A survey of swine production health problems and health maintenance expenditures. Prev Vet Med 1:357-369.
- Klinkert M.; Herman R.; Schaller H. 1985. Surface proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* identified from and *Escherichia coli* expression plasmid library Infection and Immunity. 49:329-335.
- Kobayashi, H.; Morozumi, T.; Miyamoto, C.; Shimizu, M.; Yamada, S.; Ohashi, S.; Kubo, M.; Kimura, K.; Mitani, K.; Ito, N.; and Yamamoto, K. 1996. Mycoplasma hyorhinis infection levels in lungs of piglets with porcine reproductive and

- respiratory syndrome (PRRS). *J Vet Med Sci* 8:109-113.
- Kobisch, M.; Blanchard, B.; and Le Potier, M. F. 1993. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: Duration of the disease and resistance to reinfection. *Vet Res* 24:67-77.
 - Kobisch, M.; Labbe, A.; Morvan, P.; and Cariolet, R. 1994. Evaluation of a *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine in pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida*. *Proc Int Congr Pig Vet Soc* 13:194.
 - Kobisch, M.; Milward, F.; Desmettre, P.H. 1990. Prevention of *Mycoplasma hyopneumoniae* experimental infection by vaccination: active and passive protection. *IOM Letters* Vol. 1, 8:6/6.
 - Kobisch, M.; Quillien, L.; Tillon, J.P. 1987. The *Mycoplasma hyopneumoniae* plasma membrane as a vaccine against porcine enzootic pneumonia. *Annales Institute Pasteur /Immunology*. 138:693-705.
 - Koh, H. B.; Jeong, Y. U.; Kim, J. J.; and Ahn, S. H. 1996. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* from infected herds by medication. *Proc Int Congr Pig Vet Soc* 14:240.
 - Kott, B. E. 1983. Chronological Studies of Respiratory Disease in Baby Pigs. M.S. thesis, Iowa State Univ. Kuwano, A.; Yamamoto, K.; Takei, M.; Kato, M.; and Tachi, H. 1992. Evaluation of the effect of ofloxacin on experimentally induced mycoplasmal pneumonia of swine. *Proc Int Congr Pig Vet Soc* 12:320.
 - Kristensen, B.; Paros P.H.; Nicolet, J.; Wanner, M.; Deweck, A.L. 1981. Cell mediated and humoral immune response in swine after vaccination and natural infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *American Journal Veterinary Research*. 42:784-788.
 - Kruijf, J. M., De; and Welling, A. A. W. M. 1988. Het voorkomen van chronische ontstekingen bij gelten en borgen. [Occurrence of chronic inflammatory conditions in gilts and castrated male pigs.]. *Tijdschr Diergeneeskd* 113:415-417.
 - Kubo, M.; Kimura, K.; Kobayashi, M.; Shimizu, M.; Yamada, S.; Morozumi, T.; Kobayashi, H.; Mitani, K.; Ito, N.; Yamamoto, K.; Mitura, Y.; Yamamoto, T.; and Watanabe, K. 1995. Pathological studies on natural and experimental porcine pneumonia caused by porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Jpn Agric Res Quarterly* 29:201-205.
 - Lai, S.-S.; Ho, W.-C.; and Chang, W.-M. 1986. Persistent infection of pseudorabies virus resulted in concurrent infections with *Haemophilus* spp in pigs. *Proc Int Pig Vet Soc* 9:335.
 - Lam, K.M.; Switzer W.P. 1971a. Mycoplasmal pneumonia of swine development of and indirect hemagglutination test. *American Journal Veterinary Research*. 32:1737-1741
 - Lambotte, J. L.; Pecheur, M.; Charlier, Coignoul, F.; and Deweale, A. 1990. Aerosol infection with *Bordetella bronchiseptica*: Morphological alterations in the respiratory tract and in the lung of piglets. *Proc Int Pig Vet Soc* 11:106.
 - Lara P. J. H., Torres M. E., Sánchez A., Tortora J., Cruz A., Mendoza E. S. y Ciprián C. A., Desarrollo de un modelo experimental para demostrar la interacción entre *Mycoplasma hyorhinis* y *Haemophilus parasuis*. *Memorias del XXXI Congreso de la AMVEC, A. C. Veracruz, Veracruz*, p.78, 1996.
 - Lara P. J. H., Torres M. E., Sánchez A., Tórtora J., Cruz A., Mendoza E.S. y

- Ciprián C. A., Estudio de la interacción entre *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Haemophilus parasuis*. Memorias del XXXI Congreso de la AMVEC, A.C. Veracruz, Veracruz, p.79, 1996.
- Lara P. J. H., Torres M. E., Sánchez A., Tórtora J., Cruz A., Mendoza E.S. y Ciprián C. A., Desarrollo de un modelo experimental para demostrar la interacción entre *Mycoplasma hyorhinis* y *Haemophilus parasuis*. Memorias del XXXI Congreso de la AMVEC, A.C. Veracruz, Veracruz, p.78, 1996.
 - Lara, V.; Caballero, S.; Alarcón, F.; Camacho, J.; Ciprián A. 1985. Remoción pulmonar de *Pasteurella multocida* en cerdos de engorda. Resúmenes de la XX reunión anual de AMVEC. Mérida Yucatán. pp.144-147.
 - Larivire, S.; D'Allaire, S.; DeLasalle, F.; Nadeau, M.; Moore, C.; and Ethier, R. 1990. Eradication of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1 and 5 infections in four herds. Proc Int Pig Vet Soc 11:17.
 - Larsen, H.; Høgedahl Jørgensen, P.; and J. Szancer 1990a. Eradication of *Actinobacillus pleuropneumoniae* from a breeding herd. Proc Int Pig Vet Soc 11:18.
 - Larsen, S.; Jørgensen, P. H.; and Nielsen, P. A. 1990b. Elimination of specific pathogens in 3 to 4 week piglets by use of strategic medication. Proc Int Pig Vet Soc 11:387.
 - Larsson, P.; Backstrom, L. 1971. The influence of housing design and some management systems on the health of the growing pig, particularly in relation to pneumonia. Pig News and Information. 5(4): 343-349.
 - Le Foll, P.; Amara, N.; Giral, B.; and Solignac, T. 1988. Influence de la pathologie sur la croissance des porcs entre le sevrage et l'abattage. J Rech Porc Fr 20:95-100.
 - Le Potier, M. F.; Kobisch, M.; Abiven, P.; Crevat, D.; and Desmettre, P. 1993. Blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *M. hyopneumoniae* in pigs. In Proc World Assoc Vet Lab Diagn Congr. Lyon, France, p. 208.
 - Leontides, L. 1994. Evaluation of Vaccination for Controlling the Spread of Aujeszky's Disease Virus in Endemic Regions: An Analytical Approach. Ph.D. diss. Royal Veterinary and Agricultural Univ, Copenhagen, Denmark.
 - Levonen, K.; Veijlanen, P.; and Seppänen, J. 1994. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 antibodies in sow colostrum in Finnish pig-health-scheme herds. J Vet Med (B) 41:567-573.
 - Lieschke, B.; Hoy, S. T.; Mehlhorn, G.; and Warnecke, H.-W. 1989. Auswirkungen der Rhinitis atrophicans suum auf die Schlachtleistung gleichaltriger Mastswheine unter Berücksichtigung entzündlicher Lungenveränderungen. [Effects of rhinitis atrophicans suum on slaughter yield of equally aged fattening pigs with reference to inflammatory pulmonary alterations]. Monatsh Veterinaermed 44:11-16.
 - Lindqvist, J. O. 1974. Animal health and environment in the production of fattening pigs. Acta Vet Scand (Suppl) 51:1-78.
 - Little, T. W. A. 1970. Haemophilus infection in pigs. Vet Rec 87:399-402.
 - Liim, B.; Lund, A.; and Skomsoy, A. 1994. A field study on vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. Proc Int Congr Pig Vet Soc 13:191.

- Livingstone, C.W.; Stair, E.L.; Underdahl, N.R.; Mebus, C.A. 1972. Pathogenesis of mycoplasmal pneumonia in swine. *American Journal Veterinary Research*. 33(11):2249-2258.
- Loeffen WLA, Kamp EM, Stockhofe-Zurwieden N, et al. 1999. Survey of infectious agents involved in acute respiratory disease in finishing pigs. *Veterinary Record*. 145:123-126.
- Love, R. J.; Wilson, M. R; and Tasler, G. 1985. Porcine atrophic rhinitis. *Austr Vet J* 62:377-378.
- Lukert P. D. and Allan G. M., *Porcine Circovirus en Viral Diseases, en Diseases of Swine*, 8a, edition, Edited by Barbara E. Straw, Sylvie D'Allaire, William L. Mengeling, David J. Taylor, pp 119-124, U. S. A., 1999.
- Lundeheim, N. 1979. Genetic analysis of respiratory diseases in pigs. *Acta Agric Scand* 29:209-215.
- Lundeheim, N., and Tafvelin, B. 1986. Pathological lesions at slaughter in Swedish pig production Hampshire crosses compared with Landrace and Yorkshire crosses. *Proc Int Pig Vet Soc* 9:380.
- Madec, F., and Kobisch, M. 1984. Etat sanitaire du porcelet et evolution des lesions au niveau de l'arbre respiratoire au cours des differentes phases d'levage. *J Rech Porc Fr* 16:215-235.
- Madec, F., and Kobisch, M. 1984. Etat sanitaire du porcelet et évolution des lésions au niveau de l'arbre respiratoire au cours des différentes phases d'élevage. *J Rech Porc Fr* 16:215-235.
- Madec, F.; Gourreau, J. M.; and Kaizer, C. 1982. Epidemiology of swine influenza Hsw1N1 on farms in Brittany (first outbreak N1982). *Epidemiol Sante Anim* 2:56-64.
- Madec, F.; Gourreau, J. M.; Kaizer, C.; and Aymard, M. 1990. A retrospective study about influenza infections in the pig in France. *Proc Int Pig Vet Soc* 11:201.
- Maes D., Deluyker H., Verdonck M., Castryck F., Miry C., and Kruijff A. de, Epidemiological investigations on respiratory diseases in pigs in Belgium. *Proc. 14th Int. Pig Vet. Soc. Congr. Bologna, Italy. 1996.*
- Maqueda, J.J. 1977. Incidencia de Neumonía Enzootica en varios estados productores de cerdos en la República Mexicana (Estudio preliminar). *Memorias del I Congreso Latinoamericano de Veterinarios Especialistas en Cerdos UAM-Xochimilco, México (XIII Convención AMVEC)*. p.24.
- Mare, C. J., and Switzer, W. P. 1965. New species: *Mycoplasma hyopneumoniae*, a causative agent of virus pig pneumonia. *Vet Med* 60:841-846.
- Mare. 1966. Virus pneumonia of pigs: Drug and ether sensitivity of a causative agent. *Am J Vet Res* 27:1671-1675.
- Marois, P.; DiFranco, E.; Boulay, G.; and Assaf, R. 1989. Enzootic pneumonia in feeder pigs: Association with transmissible gastroenteritis virus infection. *Can Vet J* 30:328-330.
- Martin, S. W., and Willoughby, R. A. 1972. Organic dusts, sulfur dioxide, and the respiratory tract of swine. *Arch Environ Health* 25:158-165.
- Martineau, G.; Martineau-Doize, B.; Coignoul, F.; and Dewaele, A. 1980. Bilan conmiqne traitement de la broncho-pneumonie enzootique par la tiamuline. *Ann M.d V.t* 124:369-377.
- Martineau-Doiz., B.; Larochelle, R.; Boutin, J.; and Martineau, G.-P. 1990.

- Atrophic rhinitis caused by toxigenic *Pasteurella multocida* type D: Morphometric analysis. Proc Int Pig Vet Soc 11:63.
- Martinsson, K., and Lundeheim, N. 1988. Effekter av driftsform, besötnings- och stallstorlek. Svensk Vet 40:313-319.
 - Mattsson, J. G.; Bergström, K.; Wallgren, P.; and Johansson, K. E. 1995. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by in vitro amplification of the 16S rRNA gene. J Clin Microbiol 33:893-897.
 - Mattsson, J. G.; Bergstrom, K.; Wallgren, P.; and Johansson, K.-E. 1995. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by in vitro amplification of the 16S rRNA gene. J Clin Micro 33:893-897.
 - Mebus, C. A., and Underdahl, N. R. 1977. Scanning electron microscopy of trachea and bronchi from gnotobiotic pigs inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Am J Vet Res 38:1249-1254.
 - Mebus, C.A.; Underdahl N.R. 1977. Scanning electron microscopy of tracheal and bronchi from pigs inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. American Journal Veterinary Research. 38:1249-1254.
 - Mehlhorn, G., and Hoy, S. 1985. Influence of endogenic and exogenic factors on the prevalence rate of lung lesions of fattening pigs and sows. In Proc 5th Int Congr Anim Hyg. Sept. Hannover, pp. 391-396.
 - Mendez-Trigo, E. Trigo, Viability of *Haemophilus parasuis* in tissues, exudates and pure culture swabs. Proc. 14th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Bologna, Italy, 14:314. 1996
 - Mendoza, E.S.; Pijoan, C. 2001. El estudio del PCR y las enfermedades respiratorias. Tercer Ciclo Nacional de Enfermedades Respiratorias del Cerdo. Mendoza, E.S.; Ciprián, C.A. Ed. Tercera Edición. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM y Fort Dodge Animal Health. p.193-196.
 - Mendoza, E.S.; Pijoan, C.; Torremorrel, M.; Calsamiglia, M. 1999. The PCR as tool for detecting respiratory microorganisms in pigs. Proceeding International Conference on Sustainable Animal Production Health and Environment. Future Challenges. Hisar, India. p.153.
 - Mendoza, E.S.; Pijoan, C.; Torremorrel, M.; Oliveira, S.; Cuartero, L. 2001. El PCR como una herramienta para detectar microorganismos respiratorios en cerdos. Memorias del XXXVI Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, A.C. Querétaro, Qro. Julio 25-29.p. 130.
 - Mercy, A. R., and Brennan, C. M. 1988. The Western Australia pig health monitoring scheme. Proc 5th Int Symp Vet Epidemiol Econ, Acta Vet Scand (Suppl) 84:212-214.
 - Messier, S., and Ross, R. F. 1991. Interactions of *Mycoplasma hyopneumoniae* membranes with porcine lymphocytes. Am J Vet Res 52:1497-1502.
 - Mettenleiter, T. C.; Lukacs, N.; and Rziha, H. J. 1985. Pseudorabies virus avirulent strains fail to express a major glycoprotein. J Virol 56:307-311.
 - Meyer, D. J. and Manbeck, H. B. 1986. Dust levels in mechanically ventilated swine barns. Am Soc Agr Eng Paper no. 86-4042.
 - Meyling, A., and Friis, N. F. 1972. Serological identification of a new porcine mycoplasma species, *M. flocculare*. Acta Vet Scand 13:287-289.
 - Miller, G., and Dorn, C. R. 1987. An economic summary of the national animal health monitoring system data in Ohio, 1986-87. Proc USA Health Assoc 91:154-

- Miniats, O. P., N.I. Smart, and K. Metzger. Glässer's disease in southwestern Ontario. I.A. Retrospective study, p. 279. Proc.9th. Int. Pig Vet. Soc. Congr., Barcelona, España, 1986.
- Minion, F.C.; Adams, C.; Hsu, T. 2000. R1 region of p97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine cilia. *Infection and Immunity*. 68(5): 3056-3060.
- Moore, C. 1996. Canadian perspective on PRDC. In Nat Pork Producers Council Summit, Des Moines, Iowa, pp. 129-132.
- Moormann, R. J. M.; De Rover, T.; Briarire, J.; Peeters, B. P. H.; Gielkens, A. L. J.; and Van Oirschot, J. T. 1990. Inactivation of the thymidine kinase gene of a gl deletion mutant of pseudorabies virus generates a safe but still highly immunogenic vaccine strain. *J Gen Virol* 71:1591-1595.
- Mori, Y.; Hamaoka, T.; Sato, S. 1987. Use of monoclonal antibody in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Israel Journal Medical Science*. 23:657-662.
- Mori, Y.; Hamaoka, T.; Sato, S.; Takeuchi, S. 1988. Immunoblotting analysis of antibody response in swine experimentally inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Immunology and Immunopathology*. 19:239-250.
- Morita, T.; Fukuda, H.; Awakura, T.; Shimada, A.; Umemura, T.; Kazama, S.; and Yagihashi, T. 1995. Demonstration of *Mycoplasma hyorhinis* as a possible primary pathogen for porcine otitis media. *Vet Path* 32:107-111.
- Morozumi T., Nicolet J. Morphological variations of *Haemophilus parasuis* strains. *J Clin Microbiol* 23: 138-142, 1986.
- Morozumi T., Pauli U., Braun R. Deoxyribonucleic acid relatedness among strains of *Haemophilus parasuis* and other *Haemophilus* sp. of swine origin. *Int J Syst Bacteriol* 36 : 17-19, 1986.
- Morozumi, T., and Nicolet. 1996. Morphological variations of *Haemophilus parasuis* strains. *J. Clin. Microbiol.* 23: 138-142.
- Morris, C. R.; Gardner, I. A.; Hietala, S. K.; Carpenter, T. E.; Anderson, R. J.; and Parker, K. M. 1994. Persistence of passively acquired antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae* in a swine herd. *Prev Vet Med* 21:29-41.
- Morrison, R. B.; Hilley, H. D.; and Leman A. D. 1985. Comparison of methods for assessing the prevalence and extent of pneumonia in market weight swine. *Can Vet J* 26:381-384.
- Morrison, R.B.; Pijoan, C.; Hilley, H.D.; Rapp, V. 1985. Microorganisms associated with pneumonia in slaughter weight swine. *Canadian Journal Comparative Medicine*. 49:129-137.
- Morrison, R.B.; Pijoan, C.; Leman, A.D. (1986). Association between enzootic pneumonia and performance. *Pig News and information*. 7(1): 23-31.
- Morrow, W. E. M.; Iglesias, G.; Stanislaw, C.; Stephenson, A.; and Erickson, G. 1994. Effect of a mycoplasma vaccine on average daily gain in swine. *Sw Hlth Prod* 2:13-18.
- Mortensen, S.; Mousing, J.; Henriksen, C. A.; and Andersen, J. B. 1990. Evidence of long distance transmission of Aujeszky's disease virus. II: Epidemiological and meteorological investigations. *Proc Int Pig Vet Soc* 11:279.
- Mousing, J. 1996. Economic evaluation of national eradication and control

- strategies for *Mycoplasma hyopneumoniae* in Denmark. Proc Int Pig Vet Soc 14:230.
- Mousing, J., and Christensen, G. 1993. Pathological lesions in the right and left porcine lung: Evaluation of an alternative method for scoring pneumonic lesions based on right lung examination. Acta Vet Scand 34:151-158.
 - Mousing, J.; Kooij, D.; Mortensen, S.; and McInerney, J. 1996. Economic analysis of control strategies for porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in Danish pork. Proc Int Pig Vet Soc 14:70.
 - Mousing, J.; Lybye, H.; Barfod, K.; Meyling, A.; Rønsholt, L.; and Willeberg, P. 1989. Brysthindear hos svin. Serologiske reaktioner for luftvejsinfektioner og disses sammenhæng med brysthindearfrekvensen hos slagtesvin. Dansk Vet Tidsskr 72:865-873.
 - Møller, K., and Kilian, M. 1990. V factor-dependent *Pasteurellaceae* in the porcine upper respiratory tract. J Clin Microbiol 28:2711-2716.
 - Møller, K., and M. Kilian. V factor dependent members of the family Pasteurellaceae in the porcine upper respiratory tract. J. Clin. Microbiol. 28 : 2711.2716, 1990.
 - Møller, K.; Andersen, L. V.; Christensen, G.; and Kilian, M. 1993. Optimization of the detection of NAD dependent Pasteurellaceae from the respiratory tract of slaughterhouse pigs. Vet Microbiol 36:261-271.
 - Nava, N.E.; Trujano, C.M.; Iglesias, S.J.G. 2001. Análisis serológico en granjas porcinas ubicadas en 3 estados de la República Mexicana a *Mycoplasma hyopneumoniae*. Memorias del XXXVI Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, A.C. Querétaro, Qro. Julio 25-29. pp. 132.
 - Neumann, R.; Leonhardt, W.; Ballin, A.; Mehlhorn, G.; and Diecke, S. 1985. Die Methode der intravitalen Lungensplen beim Schweinewinnung und Differenzierung von Alveolarzellen. Arch Exp Vet Med 39:525-534.
 - Neumann, R.; Mehlhorn, G.; Buchholz, I.; Johannsen, U.; and Schimmel, D. 1987. Experimentelle Untersuchung zur Wirkung einer chronischen aerogenen Schadgasbelastung des Saugferkels mit Ammoniak unterschiedlicher Konzentrationen. J Vet Med (B) 34:241-253.
 - Nicks, B.; Dechamps, P.; Canart, B.; Buzitu, S.; and Dewaele, A. 1989. Exemple de resultats inattendus lors d'un controle de la concentration en ammoniac dans une porcherie. Ann Med Vet 133:613-616.
 - Nicolet J. *Haemophilus* infections. p 426-436. In A. D. Leman, B. Straw, R.D. Glock, W.L. Mengling, R.H.C. Penny, and E. Scholl (ed.), Disease of swine, 6th ed. Iowa State University Press, Ames, 1986.
 - Nicolet, J.; Paroz P. 1980 Tween 20 soluble proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* as antigen for an enzyme-linked immunoabsorbent assay. Research Veterinary Science. 29:305-309.
 - Nicolet, J.; Paroz, P.; and Bruggmann, S. 1980. Tween 20 soluble proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* as antigen for an enzyme linked immunosorbent assay. Res Vet Sci 29:305-309.
 - Nielsen R, Danielsen V. an outbreak of Glässer's disease. Studies on etiology, serology and the effect of vaccination. Nord Vet Med. 27 : 20-25, 1975.
 - Nielsen R. pathogenicity and immunity Studies of *Haemophilus parasuis*

- serotypes. *Acta Vet Scand.* 34 : 193-198, 1993.
- Nielsen, J. P., and Frederiksen, W. 1990. Atrophic rhinitis in pigs caused by a human isolate of toxigenic *Pasteurella multocida*. *Proc Int Pig Vet Soc* 11:75.
 - Nielsen, J. P.; Foged, N. T.; Sørensen, V.; Barfod, K.; Bording, A.; and Petersen, S. K. 1991. Vaccination against progressive atrophic rhinitis with a recombinant *Pasteurella multocida* toxin derivative. *Can J Vet Res*
 - Nielsen, N. C. 1972. Preventiv medicin bestningsplan. *Medlemsbl Danske Dyrlægeforen* 55:272-281.
 - Nielsen, N. C. 1988. Mycoplasma-associated enzootic bursitis in growing pigs. *Proc Int Congr Pig Vet Soc* 10:240.
 - Nielsen, N. C.; Nielsen, E. O.; and Hagedorn-Olsen, T. 1996. Field outbreaks of *Mycoplasma hyosynoviae* polyarthritis. *Proc Int Congr Pig Vet Soc* 14:236.
 - Nielsen, R. 1988. Seroepidemiology of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can Vet J* 29:580-582.
 - Nielsen, R., and Danielsen, V. 1975. An outbreak of Glässer's disease: Studies of etiology, serology and the effect of vaccination. *Nord Vet Med* 27:20-25.
 - Nielsen, R.; Loftager, M.; and Eriksen, L. 1990. Mucosal vaccination against *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *Proc Int Pig Vet Soc* 11:13.
 - Nielsen, R.; Plambeck, T.; and Foged, N. T. 1991. Blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2. *J Clin Microbiol* 23:794-797.
 - Noyes, E. P.; Feeney, D.; and Pijoan, C. 1988. A prospective radiographic study of swine pneumonia. *Proc Int Pig Vet Soc* 10:67.
 - Noyes, E. P.; Feeny, D. A.; and Pijoan, C. 1990. Comparison of the effect of pneumonia detected during the lifetime with pneumonia detected at slaughter on growth in swine. *J Am Vet Med Assoc* 197:1025-1029.
 - Ohgami, M.; Doershuk, C. M.; English, D.; Dodek, P. M.; and Hogg, J. C. 1989. Kinetics of radiolabeled neutrophils in swine. *J Appl Physiol* 66:1881-1885.
 - Ose, E.E.; Bobbitt, J.L.; Muth, W.L. 1990. Effectiveness of experimental *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp) vaccines. I. Synergen proteins. *IOM Letters*. 1(8):70.
 - Owen, W. J. 1990. *Food Animal Disease Monitoring*. Ames, Iowa. Published by author. Paisley, L. G.; Vraa-Andersen, L.; Dybkjaer, L.; Møller, K.; Christensen, G.; Mousing, J.; and Agger, J. F. 1993a. An epidemiologic and economic study of respiratory diseases in two conventional Danish swine herds. I. Prevalence of respiratory lesions at slaughter and their effects on growth. *Acta Vet Scand* 34:319-329.
 - Owen. 1993b. An epidemiologic and economic study of respiratory diseases in two conventional Danish swine herds. II. Associations between lesions present at slaughter and mean daily gains during specific intervals of the growth period. *Acta Vet Scand* 34:331-344.
 - Palmer, D. F.; Coleman, M. T.; Dowdle, W. R.; and Schild, G. C. 1975. *Advanced Laboratory Techniques for influenza Diagnosis*. U.S. Department of Health, Education, and Welfare. Immunology series no. 6. Washington, D.C.
 - Pattison, I. H. 1956. A histological study of transmissible pneumonia of pigs characterized by extensive lymphoid hyperplasia. *Vet Rec* 68:490-494.
 - Pedersen, K. B., and Barfod, K. 1981. The aetiological significance of *Bordetella*

- bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of swine. Nord Vet Med 33:513-522.
- Petersen, G.; Weiss, D.; Egan, J.; Korshus, J.; Peters, R.; Miron, H. 1990. Response to *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination in nursing piglets. Proceeding International Pig Veterinary Society. 11. p. 84
 - Peterson, G.; Weiss, D.; Egan, J.; Korshus, J.; Peters, R.; and Miron, M. 1990. Response to *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination in nursing piglets. Proc Int Congr Pig Vet Soc 11:84.
 - Piffer, I.A.; Ross, R.F. 1984. Effect of age on susceptibility of pgs to *Mycoplasma hyopneumoniae*. American Journal Veterinary Research. 45:(3) 478-481.
 - Pijoan C. and Molitor T., Viral-Bacterial interactions in Respiratory Disease of Pigs. Proc. 12th Int. Pig Vet. Soc. Congr. The Hague. The Netherlands, 1992.
 - Pijoan, C. 1973. Studies of Mycoplasmas in relation to porcine respiratory diseases. PhD Thesis. University of Surrey.
 - Pijoan, C. 1985. Neumonía del cerdo. En encuentro sobre enfermedades infecciosas del Cerdo. Correa, G.P.; Morilla, G.A. Ed. Ediciones de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos (AMVEC). p. 85-99.
 - Pijoan, C. 1986. Micoplasmosis. En: Enfermedades de los Cerdos. Ramírez R.N.; Pijoan, A.C. Ed. México. p. 357-366.4.
 - Pijoan, C. 2001a. Actualidades en el control de las enfermedades respiratorias. Memorias del V Congreso Centroamericano y del Caribe de Porcicultura 2001. San José de Costa Rica. p. 20-21.
 - Pijoan, C. 2001b. Control de las enfermedades respiratorias. Memorias del XXXVI Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, A.C. Querétaro, Qro. Julio 25-29. p. 27-29.
 - Pijoan, C., and Leman, A. D. 1986. Veterinary services to growing and finishing pigs. Proc Int Pig Vet Soc 9:209-213.
 - Pijoan, C.; Morrison, R.B. 1985. Enzootic pneumonia of pigs: The role of *Pasteurella multocida*. Swine Consultant (Norden Smithkline CIA). p.1-6
 - Pijoan, C.; Morrison, R.B.; Hilley, H.D. 1983. Serotyping of *Pasteurella multocida* isolated from swine lungs collected at slaughter. Journal Clinical Microbiology. 17(6):1074-1076.
 - Pijoan, C.; Ochoa, G. 1978. A bactericidal substance against *Pasteurella multocida* a produce by pig embryo tracheal explants. Revista Latinoamericana Microbiología. 20(1):1-3.
 - Pijoan, C.; Trigo, F. 1986. *Pasteurella*. En: Enfermedades de los Cerdos. Ramírez R.N.; Pijoan, A.C. Ed. México. p. 327-333.
 - Pijpers, A.; Vernooy, J. A. C. M.; Leengoed, L. A. M. G. van; and Verheijden, J. H. M. 1990. Feed and water consumption in pigs following an *Actinobacillus pleuropneumoniae* challenge. Proc Int Pig Vet Soc 11:39.
 - Pointon, A. M.; Byrt, D.; and Heap, P. 1985. Effect of enzootic pneumonia of pigs on growth performance. Aust Vet J 62:13-18.
 - Pointon, A. M.; Hueston, W. D.; and Dial, G. D. 1990. Disease surveillance Reducing the uncertainty of decision making. In Proc Allen D. Leman Swine Conf, pp. 38-57.
 - Pointon, A. M.; McCloud, P.; and Heap, P. 1985. Enzootic pneumonia of pigs in South Australian Factors relating to incidence of disease. Austr Vet J 62:98-101.

- Pointon, A.M.; Bryt, D.; Heap, P. 1985. Effect of enzootic pneumonia of pigs on growth performance. *Australian Veterinary Journal*. 62: 13-18.
- Pullar, E. M. 1948. Infectious pneumonia of pigs. I. General description, differential diagnosis and epidemiology. *Aust Vet J* 24:320-330.
- Quint, W.; Gielkens, A.; Van Oirschot, J.; Berns, J.; and Cuypers, H. 1987. Construction and characterization of deletion mutants of pseudorabies virus: A new generation of live vaccines. *J Gen Virol* 68:523-534.
- Rafai, P.; Neumann, R.; Leonhardt, W.; Freny, L.; Rudas, P.; Fodor, L.; and Boros, G. 1987. Effect of environmental temperature on pigs infected with *Pasteurella multocida* type A. *Acta Vet Hung* 35:211-223.
- Ramírez, R.N. 1986. Intoxicación por gases. En: enfermedades de los Cerdos. Ramírez R.N.; Pijoan, A.C. Ed. México. p. 591.
- Rapp V.J., Gabrielson D. Comparative virulence of *Haemophilus parasuis* serovars 1 to 7 in guinea pigs. *Am J Vet Res*, 53 : 6, 987-994, 1992.
- Rapp V.J., Gabrielson D. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars among isolates from swine. *Am J Vet Res*, 53: 5, 659-664, 1992.
- Rapp V.J., Kocur G., Clark J., Muir S., and White R. Efficacy and duration of immunity of the *Haemophilus parasuis* fractions of suvaxyn® respifend® MH/HPS. Proc. 14th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Bologna, Italy, 1996.
- Rapp, V.J., R.F. Ross, and J. Nicolet. Characterization of the outer membrane proteins of *Haemophilus parasuis*, p. 262. Proc. 9th. Int. Pig Vet. Soc. Congr., Barcelona, Spain, 1986.
- Rapp-Gabrielson, V. J., *Haemophilus parasuis*, en *Diseases of Swine*, 8a, edition, Edited by Barbara E. Straw, Sylvie D'Allaire, William L. Mengeling, David J. Taylor, pp475-481, U. S. A., 1999.
- Rasmussen, J. F. 1984. The economic importance of chronic pleuritis in slaughter pig production. *Proc Int Pig Vet Soc* 8:347.
- Razin, S. 1992. *Mycoplasma* Taxonomy and Ecology. In: Maniloff, J.; McElhaney, R.N.; Finch, L.R.; Baseman, J.B. Ed. *Mycoplasmas Molecular Biology and Pathogenesis*. American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp. 3-22.
- Riley M.G., Russell E.G., Callinan R.B.. *Haemophilus parasuis* infection in swine. 171 : 649-651, 1977.
- Riley M.G., Russell E.G., Callinan R.B.. *Haemophilus parasuis* infection in swine. 171 : 649-651, 1977.
- Ro, L.H.; Ross, R.F. 1983. Comparison of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains by serologic methods. *American Journal Veterinary Research*. 44:2087-2094
- Roberts, D. H.; Johnson, C. T.; and Tew, N. C. 1972. The isolation of *Mycoplasma hyosynoviae* from an outbreak of porcine arthritis. *Vet Rec* 90:307-309.
- Roberts, D.H.; Pijoan, C. 1977. Identification of *Mycoplasma hyorhinis*. *British Veterinary*. 127; 582-587.
- Rogers, D. G.; Frey, M. L.; and Hogg, A. 1991. Conjunctivitis associated with a mycoplasma-like organism in swine. *J Am Vet Med Assoc* 198:450-452.
- Rohrbach, B. W.; Hall, R. F.; and Hitchcock, J. P. 1993. Effect of subclinical infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* in commingled feeder swine. *J Am Vet Med Assoc* 202:1095-1098.

- Rosendal, S., and Mitchell, W. R. 1983. Epidemiology of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs: A survey of Ontario pork producers. *Can J Comp Med* 47:1-5.
- Ross, R.F. 1984. Chronic pneumonia of swine with emphasis on mycoplasmal pneumonia. *Proceeding American Association of Practitioners*. U.S.A. p67
- Ross, R. F. 1978. Immunization of swine against *Mycoplasma hyosynoviae*. *Zentralbl Bakteriol (Orig A)* 241:246.
- Ross, R. F. 1984. Chronic pneumonia of swine: Emphasis on mycoplasmal pneumonia. In *Proc Am Assoc Swine Pract*. Kansas City, Mo., pp. 79-95.
- Ross, R. F., and Cox, D. F. 1988. Evaluation of tiamulin for treatment of mycoplasmal pneumonia in swine. *J Am Vet Med Assoc* 193:441-446.
- Ross, R. F., and Karmon, J. A. 1970. Heterogeneity among strains of *Mycoplasma granularum* and identification of *Mycoplasma hyosynoviae*, sp. n. *J Bacteriol* 103:707-713.
- Ross, R. F., and Spear, M. L. 1973. Role of the sow as a reservoir of infection for *Mycoplasma hyosynoviae*. *Am J Vet Res* 34:373-378.
- Ross, R. F., and Sternke, G. W. 1996. *Mycoplasma* infections of swine. In *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma*, vol 2. Ed. J. G. Tully and S. Razin. San Diego: Academic Press, pp. 275-281.
- Ross, R. F., and Whittlestone, P. 1983. Recovery of, identification of and serological response to porcine mycoplasmas. In *Methods in Mycoplasma*, vol. 2. Ed. J. G. Tully and S. Razin. New York: Academic Press.
- Ross, R. F., *Mycoplasma* Diseases, en *Diseases of Swine*, 8a, edition, Edited by Barbara E. Straw, Sylvie D'Allaire, William L. Mengeling, David J. Taylor, pp 495-509, U. S. A., 1999.
- Ross, R. F.; Jackson, J. A.; Tanner, A. C.; Andrews, J. J.; and Magonigle, R. A. 1990. In vitro and in vivo efficacy of danofloxacin against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Proc Int Congr Pig Vet Soc* 11:85.
- Ross, R. F.; Weiss, R.; and Kirchoff, H. 1977. Nachweis von *M. hyorhinis* und *M. hyosynoviae* in arthritischen Gelenken von Schweinen. *Zentralbl Veterin.med* 24:741-745.
- Ross, R. F.; Zimmermann-Erickson, B. J.; and Young, T. F. 1984. Characteristics of protective activity of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine. *Am J Vet Res* 45:1899-1905.
- Ross, R.F. 1999. *Mycoplasma* Diseases. In: Straw, B.E.; D'Allaire, S.; Mengeling, W.L.; Taylor, D.J. Ed. *Diseases of Swine*. 8th Edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa, U.S.A. pp. 495-509.
- Ross, R.F.; Zimmerman, W.; Erickson, B.J.; Young, F.T. 1984. Characteristics of protective activity of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine. *American Journal Veterinary Research*. 45:1899-1904.
- Ross. 1993. Control and elimination practices with *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. In *Iowa State Univ Sw Dis Conf for Sw Pract*, pp. 31-38.
- Rothschild, M. F.; Chen, H. L.; Christian, L. L.; Lie, W. R.; Venier, L.; Cooper, M.; Briggs, C.; and Warner, C. M. 1984. Breed and swine lymphocyte antigen haplotype differences in agglutination titers following vaccination with *B. bronchiseptica*. *J Anim Sci* 59:643-649.
- Saunders, J. R.; Osborne, A. D.; and Sebunya, T. K. 1981. Pneumonia in

Saskatchewan swine: Abattoir incidence of intrathoracic lesions in pigs from a herd infected with *Haemophilus pleuropneumoniae* and from other herds. *Can Vet J* 22:244-247.

- Scatozza, F., and Sidoli, L. 1986. Effects of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in piglets recovering from influenza. *Proc Int Pig Vet Soc* 9:150.
- Scheepens, C. J. M. 1996. Climatic stress in swine: Hazards for health. *Pig J Proc* 37:130-136.
- Scheepens, C. J. M.; Tielen, M. J. M.; and Hessing, M. J. C. 1988. Influence of climatic stress on health status of weaner pigs. In *Environment and Animal Health. Proc 6th Int Congr Anim Hyg, 14-17 June 1988, Skara, Sweden. Vol 2. Ed. I. Ekesbo. Skara, Sweden, pp. 543-547.*
- Scheidt, A.; Clark, K.; Mayrose, V.; Cline, T.; Jones, D.; and Frantz, S. 1990c. All-in, all-out as a means for improving growth in a swine herd affected by enzootic pneumonia. *Proc Int Congr Pig Vet Soc* 11:92.
- Scheidt, A.; Froe, D.; Cline, T.; Mayrose, V.; and Einstein, M. 1990b. The use of long-acting oxytetracycline (LA200tm) in two swine herds for control of enzootic pneumonia. *Proc Int Congr Pig Vet Soc* 11:87.
- Scheit, A. B.; Mayrose, V. B.; Hill, M. A.; Clark, L. K.; Cline, T. R.; Knox, K. E.; Runnels, L. J.; Frantz, S.; and Einstein, M. E. 1990. Relationship of growth performance to pneumonia and atrophic rhinitis detected in pigs at slaughter. *J Am Vet Med Assoc* 196:881-884.
- Schepers, J. A. 1990. Data requirements and objectives for economic analysis of diseases in farm livestock. In *Proc Soc Vet Epidemiol Prev Med, 4-6 June 1990. Belfast, pp. 120-132.*
- Schinca, R. 2001. Comunicación personal.
- Schlesinger, K. J.; Williams, J. M.; and Widell, P. W. 1990. Intranasal administration of pseudorabies (Bartha K61) vaccine in neonates and grow/finish pigs: Safety and efficacy of vaccination and effects of virulent challenge exposure. *Proc Int Pig Vet Soc* 11:260.
- Schuller, W.; Swoboda, R.; Baumgarten, W. 1977. Comparison of various laboratory methods for the diagnosis of enzootic pneumonia in swine. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 64:236-241
- Schuller, W.; Laber, G.; and Walzl, H. 1977a. Chemotherapeutische Untersuchungen mit 81723 hfu (Tiamulin), einem neuen Pleuromutilin-Derivat, an der experimentellen Mykoplasma-Pneumonie des Schweines. *DTW* 84:333-372.
- Schuller, W.; Neumeister, E.; and Vogl, D. 1977b. Zur Sanierung von mit Enzootischer Pneumonie versuchten Schweinebeständen. *Wien Tierärztl Monatsschr* 64:156-160.
- Schultz, R. A. 1986. Swine pneumonia: Assessing the problem in individual herds. *Vet Med* 81:757-762.
- Schultz, R. A.; Young, T. F.; Ross, R. F.; and Jeske, D. R. 1982. Prevalence of antibodies to *Haemophilus pleuropneumoniae* in Iowa swine. *Am J Vet Res* 43:1848-1851.
- Seburya, T. N. K.; Saunders, J. R.; and Osborne, A. D. 1983. A model aerosol exposure system for induction of porcine *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Can J Comp Med* 47:48-53.

- Seburnya, T.N.K.; Saunders, J.R. 1983. *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in swine: a review. *Journal American Veterinary Medical Association*. 182:1331-1336.
- Simecka, J.W.; Davis, J.K.; Davidson, M.K., Roos, S.E. Stadtlander, C.T.K-H.; Cassell, G.H. 1992. *Mycoplasma* Disease of animals. In: Maniloff, J.; McElhane, R.N.; Finch, L.R.; Baseman, J.B. Ed. *Mycoplasmas Molecular Biology and Pathogenesis*. American Society for Microbiology, Washington, D.C. Pp. 391-415.
- Simon, F.; Semjen, G.; Dobos-Kovacs, M.; Laczay, P.; and Cserep, T. 1990. Efficacy of enrofloxacin against enzootic pneumonia in swine. *Proc Int Congr Pig Vet Soc* 11:96.
- Sirois, M.; Lemire, E. G.; and Levesque, R. C. 1991. Construction of a DNA probe and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 29:1183-1187.
- Slavik, M.F. 1976. Adaptation of a latex agglutination tube test for diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae* swine pneumonia. *Diseases Abstract International*. 378: 2703-2704
- Smart, N. L.; Miniats, O. P.; Rosendal, S.; and Friendship, R. M. 1989. Glässer's disease and prevalence of subclinical infection with *Haemophilus parasuis* in swine in south Ontario. *Can Vet J* 30:339-434.
- Smith, I.M.; Hodges, RT.; Betts, A.O.; Hayward A.H.S. 1973. Experimental infections of gnotobiotic piglets with *Pasteurella septica* (sero-group A) alone or with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal Comparative Pathologic*. 83:307-321.
- Smith, J. H.; Wathes, C. M.; and Baldwin, B. A. 1996. The preference of pigs for fresh air over ammoniated air. *Appl Behav Sci* 49:417-424.
- Smith, W. J. 1983. Infectious atrophic rhinitis: Non-infectious determinants. In *Atrophic Rhinitis in Pigs*. CEC Rep Eur En. Copenhagen, pp. 149-151.
- Solano G., Pijoan C., Immunofluorescence for detecting susceptible animals to *Haemophilus parasuis*. *Proc Conf Researcher Workers in Animal Disease* 75 :p25, 1994.
- Solano G., Rapp V.J., Carvalho L., Collins J., Winkelman N., and Pijoan C. *Proc. 14th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Bologna, Italy, 1996*.
- Solano, G., *Memorias del VI Congreso ALVEC, Santa Fe de Bogotá, 1995*.
- Sorensen, K. J., and Lei, J. C. 1986. Aujeszky's disease: Blocking ELISA for the detection of serum antibodies. *J Virol Methods* 13:171-181.
- Sorensen, V.; Barfod, K.; and Feld, N. C. 1992. Evaluation of a monoclonal blocking ELISA and IHA for antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae* in SPF-pig herds. *Vet Rec* 130:488-490.
- Sorensen, V.; Barfod, K.; Feld, N. C.; and Vraa-Andersen, L. 1993. Application of enzyme-linked immunosorbent assay for the surveillance of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. *Rev Sci Tech Off Int Epizoot* 12:593-604.
- Stark, K. D. C.; Keller, H.; and Eggenberger, E. 1992. Risk factors for the reinfection of specific pathogen-free pig breeding herds with enzootic pneumonia. *Vet Rec* 131:532-535.
- Stärk, K.D.C.; Nicolet, J.; Frey, J. 1998. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by air sampling with Nested PCR assay. *Applied Environmental Microbiology*. 64 (2):543-548.

- Stegeman, J. A.; Tielen, M. J. M.; Kimman, T. G.; Van Oirschot, J. T.; Hunneman, W. A.; and Bermdsen, F. W. 1994a. Intensive regional vaccination with a gl-deleted vaccine markedly reduces pseudorabies virus infections. *Vaccine* 12:527-531.
- Stegeman, J. A.; Van Oirschot, J. T.; Kimman, T. G.; Tielen, M. J. M.; Hunneman, W. A.; and Bermdsen, F. W. 1994b. Reduction of the prevalence of pseudorabies virus-infected breeding pigs by use of intensive regional vaccination. *Am J Vet Res* 55:1381-1385.
- Stenbk, E. I., and Schirmer, A. L. 1994. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 antibodies in pig sera by an inhibition enzyme immuno assay (EIA). *Vet Microbiol* 39:231-244.
- Stipkovits, L.; Nicolet, J.; Haldimann, A.; Frey, J. 1991. Use of antibodies against the p36 protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* for the identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. *Molecular Cell Probes*. 5:451-457.
- Strasser, M.; Frey, J.; Bestetti, G.; Kobisch, M.; Nicolet, J. 1991. Cloning and expression of a novel species-specific early immunogenic 36-kilodalton of *Mycoplasma hyopneumoniae* in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 59:1217-1222.
- Strasser, M.; Nicolet, J.; Frey, J. 1990. Cloning and expression of a 36 kDa species specific immunogenic protein from *Mycoplasma hyopneumoniae* in *E. coli*. *IOM Letters*. 1(8):15.
- Straw, B. E. 1986. A look at the factors that contribute to development of swine pneumonia. *Vet Med* 81:747-756.
- Straw, B. E., and Ralston, N. 1986. Comparative costs and methods for assessing production impact on common swine diseases. In *Economics of Animal Diseases*. Proc conference held at Michigan State Univ, 23-25 June 1986, pp. 165-180.
- Straw, B. E.; Berg, E. J.; Hilley H. P.; and Leman, A. D. 1983. Pneumonia and atrophic rhinitis from a test station. *J Am Vet Med Assoc* 182:607-611.
- Straw, B. E.; Henry, S. C.; Schultz, R. S.; and Marsteller, T. A. 1986. Clinical assessment of pneumonia levels in swine through measurement of the amount of coughing. *Proc Int Pig Vet* 9:275.
- Straw, B. E.; Tuovinen, V. K.; and Bigras-Poulin, M. 1989. Estimation of the cost of pneumonia in swine herds. *J Am Vet Med Assoc* 195:1702-1706.
- Straw, B. E., D'Aillaire S., Mengeling L. W., Taylor J. D., *Diseases of Swine*, 8a, edition, Edited by, , pp 201-232, U. S. A., 1999.
- Suter, M.; Kobisch, M.; Nicolet, J. 1985. Stimulation of immunoglobulin containing cells and isotype specific antibody response in experimental *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in specific pathogen free pigs. *Infection and Immunity*. 49:615-620
- Svensmark, B.; Nielsen, K.; Dalsgaard, K.; and Willeberg, P. 1989. Epidemiological studies of piglet diarrhoea in intensively managed Danish sowherds. III. Rotavirus infection. *Acta Vet Scand* 30:63-70.
- Swenson, S. L.; Hill, H. T.; Zimmermann, J. J.; Evans, L. E.; Landgraf, J. G.; Wills, R. W.; Sanderson, T. P.; McGinley, M. J.; Brevik, A. K.; Ciszewski, D. K.; and Frey, M. L. 1994. Excretion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen after experimentally induced infection in boars. *J Am*

Vet Med Assoc 204:1943-1948.

- Switzer, W. P., and Ross, R. F. 1975. Mycoplasmal diseases. In Diseases of Swine, 4th ed. Ed. H. W. Dunne and A. D. Leman. Ames: Iowa State Univ Press, pp. 741-764.
- Switzer, W.P. 1967. Swine mycoplasmosis. Annals New York Academy of Sciences. 143:281-286.
- Sørensen, V.; Ahrens, P.; Barfod, K.; Feenstra, A. A.; Feld, N. C.; Friis, N. F.; Bille-Hansen, V.; Jensen N. E.; and Pedersen, M. W. 1997. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: Duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. Vet Microbiol 54:23-34.
- Sørensen, V.; Barfod, K.; and Feld, N. C. 1992. Evaluation of a monoclonal blocking ELISA and IHA for antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae* in SPF-pig herds. Vet Rec 130:488-490.
- Sørensen, V.; Barfod, K.; Feld, N. C.; and Vraa-Andersen, L. 1993. Application of enzyme-linked immunosorbent assay for the surveillance of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. Rev Sci Tech Off Int Epizoot 12:593-604.
- Tajima, M.; Yagihashi, T.; Nunoya, T. 1985. Ultrastructure of mycoplasmal capsules of revealed by stabilization with antiserum and staining with ruthenium red. Japanese Journal Veterinary Science. 47:221-223.
- Tajima, M.; Yagihashi, T.; Nunoya, T.; Takeuchia, O. F. 1983. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs and treatment with antithymocyte serum, immunosuppressed by thymectomy. American Journal Veterinary Research. 45:1928-1932.
- Tajima, M.; Yagihashi, T. 1982. Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* with porcine respiratory epithelium as observed by electron microscopy. Infection and Immunity. 37:1162-1169.
- Thacker, E.L.; Halbur, P.G.; Ross, R.F.; Thanawongnuwech, R.; Thacker, B.J. 1999. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus-induced pneumonia. Journal Clinical Microbiology. 37 (3):620-627.
- Thomas, P. 1984. The influence of housing design and some management systems on the health of the growing pig, particularly in relation to pneumonia. Pig News and Information. 5(4):343-349.
- Thomsen, B. L.; Jorsal, S. E.; Andersen, S.; and Willeberg, P. 1992. The Cox regression model applied to risk factor analysis of infections in the breeding and multiplying herds in the Danish SPF system. Prev Vet Med 12:287-297.
- Tielen, M. 1995. Respiratory Diseases in Pigs: Prevalence and Economical Effects. Pigs-Misset, Suppl, 4-5 June.
- Tielen, M. J. M. 1989. Integrale Qualittskontrolle: Garantie f.r Gesundheit Vortrag am 10. Intensivseminar des steirischer Schweinegesundheitsdienstes vom 2.-9. April 1989, Nassfeld, Austria.
- Tielen, M. J. M.; Truijen, W. T.; Van de Groos, C. A. M.; Verstegen, M. A. W.; D. Bruin, J. J. M.; and Conbey, R. A. P. H. 1978. De invloed van bedrijfsstructuur en stalbouw op varkensmestbedrijven op het voorkomen van longen leveraandoeningen bij slachtvarkens. [Conditions of management and the construction of piggeries on pig-fattening farms as factors in the incidence of disease of the lung and liver of slaughtered pigs]. Tijdschr Diergeneeskd

103:1155-1165.

- Topp, C.; Faulds, D.H. 1990. Cloning and nucleotide sequence of the gene for the 74.5 KD antigen, an Hsp70 homologue in *Mycoplasma hyopneumoniae*. IOM Letters. 1(8):18.
- Trigo E., Reese L., Simonson R., Efficacy of a *Haemophilus parasuis* commercial bacterin. The serological response in vaccinated pigs. Proc. 14th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Bologna, Italy, 1996.
- Trott D.J., Blackall P.J., Rapp V.J., and Hampson D.J., Genetic studies on *Haemophilus parasuis* Proc. 14th Int. Pig Vet. Soc. Congr. Bologna, Italy. 1996.
- Trujano, M., Iglesias, G. y López, C., Memorias del XXIX congreso Nacional de AMVEC, 1994, Puerto Vallarta, Jalisco.
- Tuboly, S.; Bernath, S.; Glavits, R.; and Medveczky, I. 1988. Intestinal absorption of colostral lymphoid cells in newborn piglets. Vet Immunol Immunopath 20:75-85.
- Underdahl, N. R.; Socha, T. E.; and Dorster, A. R. 1982. Long-term effect of *Bordetella bronchiseptica* infection in neonatal pigs. Am J Vet Res 43:622-625.
- Underdahl, N.R.; Kennedy, G.A.; Ramos, A.S. 1980. Duration *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in gnotobiotic pigs. Canadian Veterinary Journal. 21:258-262.
- Vahle J., Haynes J. Pathogenesis of *Haemophilus parasuis* infection: Update of current Research. Proc Am Assoc Swine Pract. 187-200, 1990.
- Vahle, J. L.; Harness, J. S.; and Andrews, J. J. 1995. Experimental reproduction of *Haemophilus parasuis* infection in swine: Clinical, bacteriological, and morphologic findings. J Vet Diagn Invest 7:476-480.
- Vairman, M.; Chardon, P.; and Renard, C. 1979. Genetic organization of the pig SLA complex: Studies on non-recombinants and biochemical lysostrip analysis. Immunogenetics 9:353-361.
- Van Buren, J. W. 1963. Lincomycin and swine mycoplasmal pneumonia indications and efficacy. Proc Am Assoc Swine Pract, Cincinnati, pp. 29-40.
- Van der Valk, P. C.; Buurman, J.; Vanderbooren, J. C. M. A.; Vermoy, J. C. M.; and Wierda, A. 1984. Automatic herd health and production control programs for swine farms. Proc Int Pig Vet Soc 8:342.
- Van Oirschot, J. T.; Houwers, D. J.; Rziha, H. J.; and Moonen, P. J. L. M. 1988. Development of an ELISA for detection of antibodies to glycoprotein I of Aujeszky's disease virus: A method for the serological differentiation between infected and vaccinated pigs. J Virol Methods 22:191-206.
- Van Oirschot, J. T.; Rhiza, H. J.; Moonen, P. J. L. M.; Pol, J. M. A.; and Van Zaane, D. 1986. Differentiation of serum antibodies from pigs vaccinated or infected with Aujeszky's disease virus by a competitive enzyme immunoassay. J Gen Virol 67:1179-1182.
- Van Reeth, K.; Koyen, A.; Pensaert, M. 1994. Clinical effects of dual infections with porcine epidemic abortion and respiratory syndrome virus. Proc Int Pig Vet Soc 13:51.
- Visser, I. J. R.; Van den Ingh, T. S. G. A. M.; Kruijf, J. M.; Tielen, M. J. M.; Urlings, H. A. P.; and Gruys, E. 1988. Atrofische rhinitis: Beoordeling van de lengtedoorsnede van varkenskoppen aan de slachtlijn ter bepaling van voorkomen en mate van concha-atrofie. [Atrophic rhinitis: The use of longitudinal

- sections of pigs heads in the diagnosis of atrophy of the turbinate bones at the slaughter line.] *Tijdschr Diergeneeskd* 113:1345-1355.
- Von Borell, E. 1996. Current situation on welfare legislation and research within the European Union. *Pig News Inf* 17:105N-107N.
 - Wallgren, P.; Beskow, P.; Fellstrom, C.; and Renstrom, L. H. M. 1994. Porcine lung lesions at slaughter and their correlation to the incidence of infections by *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* during the rearing period. *J Vet Med (B)* 41:441-452.
 - Wallgren, P.; Mattsson, S.; Artursson, K.; and Bolske, G. 1990. The relationship between *Mycoplasma hyopneumoniae* infection, age at slaughter and lung lesions at slaughter. *Proc Int Pig Vet Soc* 11:82.
 - Wallgren, P.; Schwan, O.; Mattsson, S.; and Bolske, G. 1996. Comparison of the sensitivity of two ELISA systems for detection of antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae* in naturally infected herds. *Proc Int Congr Pig Vet Soc* 14:217.
 - Wannemuehler, M. W.; Minion, F. C.; and Ross, R. F. 1988. Immune suppression of *Mycoplasma hyopneumoniae* infected swine. *Proc Int Org Mycoplasmol* 7:72.
 - Wathes, C. M. 1983. Ventilation, air hygiene and animal health. *Vet Rec* 113:554-559.
 - Weibel, W.; Bihlmann, J.; and Hani, H.; 1983. Vergleichende Untersuchungen über Mortalität, Morbidität und Mastleistung in konventionellen und dem Schweinegesundheitsdienst angeschlossenen Mastbetrieben. III. Morbidität und Mastleistung. *Schweiz Arch Tierheilkd* 125:861-869.
 - Weiss, D. L., and Petersen, G. R. 1992. *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin field efficacy study. *Proc Int Pig Vet Soc* 12:305.
 - Weng, C. N., and Lin, W. H. 1988. Cell-mediated immune response in pig after *Mycoplasma hyopneumoniae* infection: Effect of immunosuppression on pneumonia in pig
 - Wensvoort, G.; Terpstra, C.; Laak, E. A.; Bloemraad, M.; Kluyver, E. P.; Kragten, C.; Buiten, L.; Besten, A.; Wagenaar, F.; Broekhuijsen, J. M.; Moonen, P. J. L. M.; Zetstra, T.; Boer, E. A.; Tibben, H. J.; Jong, M. F.; Veld, P.; Groenland, G. J. R.; Gennep, J. A.; Voets, M. Th.; Verheijden, J. H. M.; and Braamskamp, J. 1991. Mystery swine disease in the Netherlands: The isolation of Lelystad virus. *Vet Quart* 13:121-130.
 - Whittmore Colin T., *Producción del cerdo*, Primera Edición 1988, Ed. AEDOS, S. A., Barcelona, España.
 - Whittlestone, P. 1972. Pathogenic Mycoplasma. CIBA Foundation Symposium. pp. 263-283.
 - Whittlestone, P. 1973. Enzootic pneumonia of pigs (EPP). *Advances Veterinary Science Comparative. Medicine.* 17:1-55.
 - Whittlestone, P. 1972. The role of mycoplasmas in the production of pneumonia in the pig. In *Pathogenic Mycoplasmas*. Amsterdam: Associated Scientific Publishers, pp. 263-283.
 - Whittlestone. 1979. Porcine mycoplasmas. In *The Mycoplasmas*. Vol. 2, Human and Animal Mycoplasmas. Ed. J. G. Tully and R. F. Whitcomb. New York: Academic Press, pp. 133-176.
 - Willeberg, P.; Gardner, I. A.; Mortensen, S.; and Mousing, J. 1994. Model of herd

- size effects in swine diseases. Proc 7th Int Symp Vet Epidemiol Econ, Kenya Vet 18:189-191.
- Willeberg, P.; Gerbola, M.-A.; Kirkegaard Petersen, B.; and Andersen, J. B. 1984/85. The Danish pig health scheme: Nation-wide computerbased abattoir surveillance and follow-up at the herd level. *Prev Vet Med* 3:79-91.
 - Willeberg, P.; Mortensen, S.; and Mousing, J. 1995. Effect of herd size on spread of contagious disease. In *Proc Animal Health and Related Problems in Densely Populated Livestock Areas of the Community*, Brussels, 22-23 Nov 1994. EUR 16609 EN, pp. 53-67.
 - Williams, P.P.; Gallagher, J. E. 1978. Cytopathogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal ring and lung explant organ cultures alone and in combination with monolayer cultures of fetal lung fibroblast. *Infection and Immunity*. 20(2):495-502.
 - Wilson, M. R.; Takov, R.; Friendship, R. M.; Martin, S. W.; McMillan, I.; Hacker, R. R.; and Swaminathan, S. 1986. Prevalence of respiratory diseases and their association with growth rate and space in randomly selected swine herds. *Can J Vet Res* 50:209-216.
 - Windsor, H. M.; Ripley, P. H.; and Hannan, P. C. T. 1996. An in vitro investigation of the sensitivity of German field isolates of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyosynoviae* to SDZ PMD 296, a new pleuromulin derivative. *Proc Int Congr Pig Vet Soc* 14:226.
 - Wittlestone, P. 1979. Porcine Mycoplasmas. In: Tully, J.G.; Whitcomb, R.F. Ed. *The Mycoplasmas*, vol. II Human and Animal Mycoplasmas. Academic Press. pp.133-176.
 - Yagihashi, T.; Kazama, S.; and Tajima, M. 1993. Seroepidemiology of mycoplasmal pneumonia of swine in Japan as surveyed by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Micro* 34:155-166.
 - Yagihashi, T.; Nunoya, T.; Mitui, T.; and Tajima, M. 1984. Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection on development of *Haemophilus pleuropneumoniae* pneumonia in pigs. *Jpn J Vet Sci* 46:705-713.
 - Young, F.T.; Ciang, Yu-Wei; Ross, R.F. 1990 Evaluation of local and systemic humoral responses to *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Proceeding International Pig Veterinary Society*. p.97
 - Young, F.T.; Ross, R.F. 1987. Assesment of antibody response of swine infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* by immunoblotting. *American Journal Veterinary Research*. 48:651-656.
 - Young, T. F.; Ross, R. F.; and Drisko, J. 1983. Prevalence of antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae* in Iowa swine. *Am J Vet Res* 44:1946-1948.
 - Zhang, Q.; Young, T. F.; and Ross, R. F. 1995. Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. *Inf Immun* 63:1013-1019.
 - Zhang, Q.; Young, T.F.; Ross, R.F. 1994. Microtiter plate adherence assay and receptor analogs for *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Infection and Immunity*. 62(5):1616-1622.
 - Zielinski, G. C.; Young, T.; Ross, R. F.; and Rosenbusch, R. F. 1990. Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to cell monolayers. *Am J Vet Res* 51:339-343.
 - Zielinski, G., and Ross, R. F. 1993. Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae*

to porcine ciliated respiratory tract cells. Am J Vet Res 54:1262-1269.

- Zielinski, G.C.; Ross, R.F. 1993. Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine ciliated respiratory tract cells. American Journal Veterinary Research. 54(8): 1262-1269.
- Zimmerman, W. 1990. Erfahrungen mit der EP-Teilsanierung im Tilgungsprogramm des Schweizerischen Schweinegesundheitsdienstes (SGD). Tierarztl Umschau 45:556-562.
- Zimmermann, B. J., and Ross, R. F. 1982. Antibody response of swine experimentally infected with *Mycoplasma hyosynoviae*. Vet Microbiol 7:135-146.
- Zimmermann, W.; Odermatt, W.; and Tschudi, P. 1989. Enzootische Pneumonie (EP): Die Teilsanierung EP-reinfizierter Schweinezuchtbetriebe als Alternative zur Totalsanierung. Schweiz Arch Tierheilkd 131:179-191.
- Zimmermann, W.; Tschudi, P.; and Nicolet, J. 1986. ELISA serologie in Blut und Kolostralmilch: Eine Möglichkeit zur Überwachung der enzootische Pneumonie (EP) in Schweine-Beständen. Schweiz Arch Tierheilkd 128:299-306.