



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN**

**MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**TESIS**

**"ACTUALIZACIÓN BIBLIOGRÁFICA DE LAS TÉCNICAS DE  
DIAGNÓSTICO DE *Mycoplasma hyopneumoniae*"**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

REYES HERNÁNDEZ JOSÉ FRANCISCO

ASESOR

DR. TONATIUH A. CRUZ SÁNCHEZ

COASESOR

MVZ. SOCORRO SANDRA MARTÍNEZ ROBLES

**Proyecto PAPIIT IN 29071**

Análisis de las poblaciones celulares del tracto respiratorio  
porcino ante la infección de *Mycoplasma hyopneumoniae*



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.

## **DEDICATORIAS**

### **A MI ESPOSA:**

Por estar siempre a mi lado y compartir tu vida conmigo aún en los momentos más difíciles, por ser el pilar de nuestro hogar y por apoyarme e impulsarme a lograr mi meta. Espero que este logro no sea el último que compartamos.

Te amo.

### **A MIS HIJOS:**

Arturo y Asael, por alegrar mi vida y ser mi motivo de superación. Recuerden que la vida está llena de retos y sacrificios, pero al final, se obtiene la recompensa. Ustedes son la mayor recompensa de mi vida, espero que mis triunfos se reflejen en su vida.

Los amo.

### **A MIS PADRES:**

Por su apoyo incondicional ya que no es fácil llevar auestas la responsabilidad de un hogar y estudiar al mismo tiempo, pero sobre todo por transmitirme su ejemplo de bondad, cariño y respeto. Espero que este triunfo sea satisfactorio para ustedes como lo es para mí.

Los quiero, admiro y respeto.

### **A mis amigos:**

Nacho, Nalleli y Josué, con quienes pude contar siempre y compartir momentos de felicidad pero también de carencia.

Que nuestra amistad perdure.

FRANCISCO

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A mi asesor:**

El Dr. Tonatiuh Cruz Sánchez por brindarme su apoyo para lograr un objetivo más en mi vida profesional.

### **A mi coasesor:**

La MVZ. Sandra Martínez Robles, quien merece el mismo crédito al apoyarme en todo momento. Gracias por su apoyo profesional y por escucharme cuando lo necesité.

### **A la escuela:**

Por brindarme un lugar y la oportunidad de cumplir uno de mis anhelos más grandes en la vida.

## **INDICE**

### **1. CAPITULO I**

1.1 INTRODUCCION -----	1
1.2 IMPACTO ECONOMICO -----	2
1.3 DEFINICIÓN DE LA NEUMONÍA EZOÓTICA -----	4
1.4 ETIOLOGÍA -----	6
1.5 EPIZOOTIOLOGÍA -----	7
1.6 INMUNIDAD -----	7
1.7 PATOGÉNESIS -----	9
1.8 SIGNOLOGÍA -----	10
1.9 LESIONES -----	11
1.10 DIAGNOSTICO -----	14
1.11 TRATAMIENTO -----	14
1.12 CONTROL Y PREVENCIÓN -----	15

### **2. CAPITULO II**

2.1 CLASIFICACION TAXONOMICA -----	17
2.2 MEDIOS DE CULTIVO -----	17
2.3 TINCIONES DE COLONIAS DE MICOPLASMA -----	27

### **3. CAPITULO III TOMA Y ENVIO DE MUESTRAS**

3.1 TOMA DE MUESTRAS -----	30
3.2 OBTENCIÓN DEL ESPECIMEN-----	32
3.3 ENVIO DE MUESTRAS -----	36
3.4 PROCEDIMIENTO DE AISLAMIENTO DE MICOPLASMAS DE LAS MUESTRAS PULMONARES .EN EL LABORATORIO -----	38

### **4. CAPITULO IV PRUEBAS DE DIAGNOSTICO**

#### **PRUEBAS BIOQUÍMICAS**

4.1 DEPENDENCIA DE ESTEROLES -----	41
------------------------------------	----

4.2 FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS -----	43
4.3 HIDRÓLISIS DE LA ARGININA -----	44
4.4 PRODUCCIÓN DE PEROXIDO DE HIDRÓGENO -----	45
4.5 FORMACIÓN DE PELÍCULA Y MANCHAS -----	46
4.6 REDUCCIÓN DEL TETRAZOLIO -----	46
4.7 HIDRÓLISIS DE LA UREA -----	47

## **PRUEBAS SEROLOGICAS EN LA IDENTIFICACION DE MICOPLASMAS**

4.8 PRODUCCIÓN Y TITULACIÓN DE SUEROS HIPERINMUNES CONTRA <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> . -----	49
4.9 PRUEBAS DE NEUTRALIZACIÓN -----	51
4.10 PRUEBA DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO -----	52
4.11 PRUEBA DE INHIBICIÓN METABÓLICA -----	52

## **PRUEBAS DE DIAGNOSTICO EN TEJIDO PULMONAR**

4.12 INMUNOFLUORESCENCIA -----	53
4.13 TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA -----	54
4.14 TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA -----	55
4.15 PRUEBA DE EPIFLUORESCENCIA -----	57
4.16 INMUNOPEROXIDASA DIRECTA -----	58
4.17 INMUNOPEROXIDASA INDIRECTA -----	59

## **INMUNODIAGNOSTICO**

4.18 ANALISIS INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMA (ELISA) ---	61
--	----

## **DIAGNOSTICO MOLECULAR**

4.19 REACCION DE CADENA DE LA POLIMERASA -----	65
--	----

<b>5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS -----</b>	<b>69</b>
--	-----------

## INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

### CAPITULO I

Fig. 1 Ápice del lóbulo craneal mostrando consolidación violácea causada por *Mycoplasma hyopneumoniae*----- 11

Fig. 2 Lesiones observadas en un cerdo inoculado con *Mycoplasma hyopneumoniae* ----- 12

Fig. 3 (A) Corte histológico de un pulmón normal (Azul de Toluidina). (B) Sección de pulmón infectado con *M. hyopneumoniae* donde se muestra la proliferación linfoblástica y formación de BALT (inmunohistoquímica para CD4<sup>+</sup> 10X) ----- 13

### CAPITULO II

Fig.4 Cultivo celular infectado de *M.hyopneumoniae*, se observan vacuolas y muchos micoplasmas en el citoplasma.  
(Cortesía Dr. Pijoan) ----- 29

### CAPÍTULO III

Fig. 5 Material indispensable para obtener especímenes para diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae* ----- 32

Fig. 6 *Mycoplasma hyopneumoniae* se encuentra alrededor de los bronquios principales, es indispensable tomar muestra del área señalada -----32

Fig.7 Pulmones extendidos, libres de sangre con lesiones discretas de Neumonía enzoótica, A) Vista frontal del a lesión en el lóbulo apical derecho, B) vista lateral de la misma lesión ----- 33

Fig. 8 Corte del ápice pulmonar con tijeras de punta roma sin óxido ni contaminantes en las hojas ----- 33

Fig. 9 El tejido se cubre en su totalidad con el crioprotector desde el momento en que se hace el corte A) espécimen cubierto de crioprotector B) el vial contiene suficiente crioprotector y es introducida la muestra C) la muestra es totalmente cubierta con crioprotector ----- 34

Fig. 10 A) contenedor que baja la temperatura de 20 a 4°C. B) el contenedor a 4°C debe identificarse correctamente para su envío y pronto ----- 35

Fig. 11 A) Colonias de gotas de rocío de *Mycoplasma hyopneumoniae* en medio de Friis (10X).B) Colonias de *Mycoplasma hyopneumoniae* aisladas de pulmones en medio de Friis (40X) ----- 39

Fig. 12 Diagrama para el cultivo, aislamiento e identificación de *Mycoplasma hyopneumoniae*<sup>(37)</sup>

**CAPITULO IV**

Fig. 13 Zona de inhibición de crecimiento entre el sensidisco (color oscuro) y las colonias de micoplasma por la acción de digitonina (25X) ----- 42

Fig. 14 Inhibición de crecimiento negativa entre el sensidisco (color oscuro) y las colonias de micoplasma por la acción de digitonina (25X) ----- 42

Fig.15 A) Producción de peroxido de hidrógeno por una cepa de *Mycoplasma hyorhinis*, pueden apreciarse glóbulos rojos alrededor de la colonia teñidos de azul. B) Producción de peróxido negativa por la colonia de *M. Hyopneumoniae* ----- 46

CUADRO 1 Pruebas primarias del género *Mycoplasma* ----- 47

CUADRO 2 Caracterización bioquímica de los micoplasmas porcinos -----48

Fig. 16 Prueba de inhibición de crecimiento entre el sensidisco impreganado con antisuero contra *M. hyopneumoniae* y las colonias del micoplasma.

A. Reacción negativa B. Reacción positiva ----- 53

Fig.17 A) Ejemplo representativo de un control negativo a la prueba de Inmunofluorescencia de un corte de pulmón fetal (10X).B) Observación de focos fluorescentes de un corte de pulmón positivo al aislamiento de *M. hyopneumoiniae* (10X) ----- 55

Cuadro 3. Controles de la Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta ----- 56

Fig. 18 A) Observación de focos fluorescentes de improntas de colonias de micoplasmas (40X).B) Colonias de micoplasmas fluorescentes mediante la técnica de Inmunofluorescencia indirecta sobre medio de Friis (25X) ----- 58

Fig.19 A) Ejemplo representativo de un control negativo a la prueba de inmunoperoxidasa, proveniente de un pulmón fetal porcino (10X).B) Prueba de inmunoperoxidasa positiva donde se muestran estructuras café rojizas de *M. hyopneumoniae* adheridos al epitelio (flecha) 10 X ----- 61

Fig.20 Prueba de ELISA. Se muestra una microplaca con los siguientes resultados: 1er carril antígeno solo. 2º carril: suero control negativo proveniente de un cerdo libre de enfermedades respiratorias. 3er carril: suero control positivo proveniente de un cerdo inoculado con *M. hyopneumoniae*. Los demás carriles corresponden a diversos sueros de cerdos infectados naturalmente (de campo). Se realizaron diluciones dobles de los sueros ----- 64

Fig. 21 Gel de electroforesis en agarosa al 1% que muestra las reacciones de PCR para el diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae* A: marcadores de bases de nucleótidos B y C: controles negativos, D: control positivo, a partir de esta columna todas las siguientes que tienen una banda inferior son positivas y proceden de casos clínicos ----- 68

## ***PRESENTACIÓN***

Los problemas neumónicos en cerdos, juegan un papel importante en la producción porcina mundial, siendo la Neumonía Enzoótica una afección que ha tenido gran relevancia en este renglón.

La alta incidencia de lesiones pulmonares en los cerdos es la causa de daños considerables, por lo que el estudio de las neumonías porcinas es necesario y la investigación de su etiología es primordial, con el objeto de hallar su prevención y control.

El propósito de este manual es describir en forma concisa y accesible los procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la neumonía Enzoótica, con el objeto de llenar un vacío que se tiene en los laboratorios de diagnóstico, en cuanto a las técnicas empleadas para esta enfermedad.

Consideramos que esta edición pueda ser una herramienta útil al Médico Veterinario y personal de laboratorio, por el cual podrá orientar y establecer el diagnóstico y contribuir con ello al control de esta neumonía dentro de la porcicultura nacional.

## **CAPITULO I**

### **1.1 INTRODUCCIÓN**

La industria porcina se encuentra actualmente ante una serie de retos y cambios muy dinámicos, caracterizados principalmente por la búsqueda del mejoramiento productivo que le permita mantenerse a un nivel competitivo dentro del marco de globalización comercial desarrollado en los últimos años<sup>(21)</sup>.

Sin embargo existen riesgos que pueden afectar los resultados de la producción; como la presencia de diversos agentes potencialmente patógenos y que bajo ciertas condiciones, pueden causar enfermedades clínicamente observables. Estos microorganismos pueden estar presentes en cualquier tipo de explotación porcina<sup>(21)</sup>.

Dentro de las enfermedades que afectan comúnmente a los cerdos, están las que pertenecen al grupo de afecciones del aparato respiratorio como son las neumonías por *Pasteurella multocida* tipo A y tipo D toxigénica, por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, virus de la influenza porcina, y rinitis atrófica causada por *Bordetella bronchiseptica*<sup>(17, 52)</sup>.

La neumonía permanece como una de las principales causas de pérdidas económicas en la industria porcina a nivel mundial afectando principalmente a las explotaciones de tipo intensivo<sup>(7,21, 44)</sup>.

Las enfermedades respiratorias reducen las ganancias de las explotaciones porcinas, ya que disminuyen la tasa de crecimiento de los animales afectados<sup>(7, 28, 49)</sup> y en casos severos producen la muerte<sup>(20)</sup>.

Un estudio realizado por Cruz ST *et al* .en 1984 y que hasta la fecha se mantiene válido, demostró en varios países que la tasa de crecimiento disminuyó en los animales afectados y virtualmente son sacrificados a una mayor edad, además de observarse un incremento en la ingestión de alimentos <sup>(19, 54)</sup> .

La neumonía enzoótica es una enfermedad que se presenta en granjas porcinas en todo el mundo y es también una de las enfermedades más comunes y de mayor importancia económica <sup>(44, 49)</sup> . La neumonía enzoótica ha recibido varios nombres entre los que se encuentran: neumonía bacteriana, neumonía micoplásmica, neumonía porcina, neumonía infecciosa, y más recientemente los investigadores le han denominado MIRD Complex, (Complejo de Enfermedades Respiratorias Inducidas por Mycoplasma) en virtud de la relación de este microorganismo con otros agentes patógenos causantes de enfermedades respiratorias en el cerdo <sup>(20, 40, 54)</sup> .

Se puede considerar que la neumonía enzoótica en numerosos casos no es diagnosticada, por lo que generalmente es una enfermedad latente en muchas granjas y que es diseminada comúnmente a otras granjas de producción <sup>(5)</sup> .

### 1.2 IMPACTO ECONÓMICO

La neumonía en cerdos en etapas de crecimiento y finalización provoca pérdidas económicas considerables en todas las explotaciones porcinas <sup>(21)</sup> , cuando *Mycoplasma hyopneumoniae* esta ausente en los cerdos de crecimiento y finalización las neumonías son de poco impacto <sup>(7, 9)</sup> .

Se ha determinado que por cada 10% de lesión pulmonar, existe una disminución del 5% en la ganancia diaria de peso <sup>(40)</sup> . En un estudio realizado en 1991 se encontró que los animales disminuían el peso corporal en 30 gr. Por día y el consumo de alimento en 23 gramos por día cuando había neumonía o pleuresía <sup>(25)</sup> .

El costo de producción de los cerdos afectados por *M. hyopneumoniae* es elevado si se considera que de 30 a 80% de los cerdos que son sacrificados en el matadero presentan lesiones ocasionadas por el microorganismo. Asimismo, debe considerarse que los cerdos afectados son muy susceptibles a infecciones bacterianas secundarias del tracto respiratorio, desarrollándose así el complejo de Enfermedad Respiratoria Inducido por Mycoplasma (CERIM), el cual puede ser aún más impactante cuando el aire del ambiente, donde se desarrollan los cerdos, presentan mayor concentración de gases como el amoníaco. En estos casos los signos clínicos serán agravados y como resultado se afectará la ganancia diaria de peso (GDP) y la eficiencia alimenticia<sup>(21)</sup>.

La neumonía crónica de los cerdos en crecimiento y finalización es muy común y su prevalencia varía desde un 25 a un 93%, el grado de severidad de la infección cambia sustancialmente de acuerdo al manejo, estación del año, ventilación, humedad, tipo de alimento y concentración de los cerdos<sup>(19, 24)</sup>, entre los cuales debemos considerar la interrelación de los cerdos con su medio ambiente y la presencia de los microorganismos, la cual deberá guardar un estado de equilibrio; cuando esto es alterado, se pueden dar las condiciones para iniciarse una enfermedad. Generalmente durante este proceso se encuentran alterados los sistemas de defensa (específicos e inespecíficos) de los individuos afectados y en muchos de estos casos el factor condicionante es el estrés al que se someten los animales durante varias fases de su vida productiva: destete, traslado de cerdos al área de engorda entre otras. Todo ello favorece la multiplicación de estos microorganismos creándose un alto nivel de desafío (presión de infección) para los demás animales susceptibles que se encuentran alojados en la misma unidad. Sin embargo, debemos considerar cada una de estas situaciones como un proceso multifactorial donde, además del animal deprimido en sus defensas, existen una serie de características en los agentes potencialmente dañinos tales como su grado de patogenicidad o virulencia, dentro y fuera de los cerdos, su asociación con otros microorganismos con los que producen alteraciones más graves. Además un

número inadecuado de animales alojados dentro de un mismo ambiente será un aspecto muy importante que vaya en detrimento de la inmunidad del cerdo. La inmunidad pasiva (por medio del calostro) o activa (por medio de vacunación) puede no ser suficiente para el control de los procesos de enfermedad, de la misma manera influye el que estos animales sean de diferentes edades o etapas de producción <sup>(9,21)</sup>.

Lo descrito anteriormente traerá como resultado diferentes niveles de presión de infección:

**Presión de infección muy baja:** generalmente no aparecen signos clínicos aunque, en el caso de las enfermedades respiratorias se encuentran lesiones pulmonares ya sea a la necropsia o a la inspección en el rastro.

**Presión de infección incrementada:** la observación de los signos clínicos será en el periodo de engorda.

**Presión de infección incrementada rápidamente a edad temprana:**

Los signos clínicos respiratorios podrán observarse desde la etapa de destete <sup>(21)</sup>.

### **1.3 DEFINICIÓN DE LA NEUMONÍA ENZOÓTICA**

Es un síndrome con baja mortalidad pero con grave impacto en los parámetros productivos de los cerdos de engorda, disminuyendo la ganancia media diaria y eficiencia de conversión, además el daño epitelial causado por el microorganismo predispone a infecciones secundarias que complican el cuadro clínico y el control de procesos respiratorios más graves <sup>(7,9,19,20,21,26,37,44)</sup>.

### Historia General

La posibilidad de que un micoplasma estuviera involucrado en la Neumonía Enzoótica fue investigada por dos grupos; uno de ellos en Iowa y el otro en Cambridge Inglaterra. Ambos reportaron en 1965 un micoplasma que producía neumonía típica en los cerdos al cual los americanos llamaron *Mycoplasma hyopneumoniae* y los ingleses *Mycoplasma suis pneumoniae*, posteriormente mediante la prueba de inhibición metabólica, se demostró que eran serológicamente idénticos. El comité de Nomenclatura de Micoplasmas dio prioridad al uso de *Mycoplasma hyopneumoniae*<sup>(5, 9,16)</sup>.

Las investigaciones sobre las enfermedades respiratorias en nuestro país se comienzan a realizar en los años setentas y es donde se da a conocer la incidencia de Neumonía Enzoótica en varios estados productores de cerdos por la presencia de lesiones pulmonares, pero no se demostró la presencia del agente causal *Mycoplasma hyopneumoniae* por algún método de laboratorio<sup>(14)</sup>.

En México en el año 1987, Gilberto Ochoa y Carlos Pijoan<sup>(14)</sup> se dieron a la tarea de formar un Postgrado en Microbiología Veterinaria, creando dentro de este programa la línea de investigación sobre las enfermedades respiratorias del cerdo; se realizaron estudios en un rastro para determinar los patógenos más involucrados en las neumonías de los cerdos, *Pasteurella multocida* fue el agente comúnmente encontrado, sin embargo, también fueron encontradas lesiones en muchos de estos procesos que sugerían que *Mycoplasma hyopneumoniae* era el causante de la neumonía enzoótica de los animales de rastro<sup>(14)</sup>.

En 1982 en la Ciudad de México, fue celebrado el Congreso de la Sociedad Internacional de Veterinarios Especialistas en Cerdos (IPVS) por sus siglas en inglés. Pijoan (*et. al*) por medio de la prueba de inmunofluorescencia indirecta dan a conocer la presencia de *Mycoplasma hyopneumoniae* en el país. En 1986 Ciprián y Cruz<sup>(14)</sup> dan a conocer el aislamiento e identificación de *Mycoplasma*

*hyopneumoniae* y *Mycoplasma flocculare* a partir de casos típicos de neumonía enzoótica en animales de rastro<sup>(14)</sup>. En ese mismo año, en un trabajo conjunto entre La Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán UNAM, El Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) y La Universidad de Minnesota, demostraron en forma experimental la interacción *Mycoplasma hyopneumoniae*-*Pasteurella multocida* en el desarrollo de la neumonía crónica de los cerdos, demostrando además, que la infección previa por *Mycoplasma hyopneumoniae* favorece la colonización y daño pulmonar por *Pasteurella multocida*; obteniendo con esta investigación el premio por el mejor trabajo del área de Sanidad Animal en la XXI Reunión Anual de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos (AMVEC) en 1986<sup>(14)</sup>.

### 1.4 ETIOLOGÍA

*Mycoplasma hyopneumoniae* se caracteriza por ser un organismo pleomórfico, depende de colesterol y fermenta la glucosa, es el más exigente y delicado del género *Mycoplasma*, su aislamiento es complicado debido a sus extremos requerimientos de crecimiento y a la frecuente presencia de *Mycoplasma hyorhinis* en las neumonías del cerdo<sup>(16, 20 y 44)</sup>. La observación con microscopía electrónica revela la presencia de pequeños filamentos y una cápsula<sup>(16)</sup>. 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 da la apariencia de huevo estrellado como lo hacen otros micoplasmas, algunos autores la observan como "gotas de rocío". Cuando se tiñe con Giemsa se observan cocobacilos delgados de 0.1 a 0.2 micrómetros de diámetro. El medio de cultivo debe contener esencialmente suero de cerdo o de caballo (como fuente de colesterol), levadura, penicilina y permanecer en condiciones microaerófilas (5-10% de CO<sub>2</sub>)<sup>(16)</sup>.

### **1.5 EPIZOOTIOLOGIA.**

La transmisión de *Mycoplasma hyopneumoniae* es mediante aerosoles o por contacto directo con secreciones del tracto respiratorio de cerdos infectados. En la mayoría de los casos, la fuente de contaminación es la cerda joven con menos de 3 partos, la cual tiene un bajo nivel de inmunidad y por lo general se encuentra infectada por *Mycoplasma hyopneumoniae*. Por lo tanto la cerda infecta a los lechones porque éstas tienen bajos niveles de anticuerpos maternos, en consecuencia el desarrollo de la enfermedad se ve influenciado por la inmunidad pasiva del lechón y la dosis infectante a la que se exponga. Por su parte las cerdas adultas aunque tienden a ser inmunes y a no infectarse, sus camadas llegan a la crianza totalmente susceptibles porque la inmunidad pasiva comienza a disminuir entre las 4 y 6 semanas de edad <sup>(20, 21)</sup>.

A pesar de que las infecciones de *Mycoplasma hyopneumoniae* tienden a iniciarse en la maternidad, la principal forma de transmisión es la horizontal en el momento del destete, a través del contacto naso-nasal entre lechones procedentes de cerdas jóvenes y lechones procedentes de cerdas adultas con inmunidades lactogénicas desfasadas <sup>(20, 21 y 40)</sup>.

En virtud del periodo de incubación, la lenta diseminación del microorganismo en las camadas, el incremento en la densidad de la población animal, la diseminación de otros agentes y factores del medio ambiente que se desarrollan después del destete, la prevalencia mayor de la enfermedad ocurre en los cerdos en crecimiento y finalización <sup>(20)</sup>.

### **1.6 INMUNIDAD.**

Muchos cerdos experimentan la primera infección con *Mycoplasma hyopneumoniae* a una edad joven, usualmente sin mostrar signos clínicos. Aparentemente la baja presión de infección y la protección ofrecida por los anticuerpos maternos son capaces de mantener una baja incidencia de la enfermedad a una edad temprana <sup>(21)</sup>.

Cuando la protección por anticuerpos maternos ha declinado, la influencia de un estrés y factores adversos de manejo, los cerdos desarrollan la enfermedad y presentan una marcada seroconversión. Los cerdos usualmente sobreviven y desarrollan una fuerte inmunidad contra *Mycoplasma hyopneumoniae*. Además de la inmunidad humoral, la inmunidad celular juega un papel mayor en la protección, lo que significa que los niveles de anticuerpos medidos después de la vacunación no son el único indicio de protección <sup>(21, 48)</sup>.

Existe primero una interacción entre *Mycoplasma hyopneumoniae* y células específicas localizadas en el pulmón, nódulos linfoides, retrofaríngeos y bronquiales, se producen inmunoglobulinas en secreciones traqueobronquiales en una cantidad elevada a las dos semanas postinfección <sup>(16)</sup>.

Posteriormente se han observado células con inmunoglobulinas específicas en su superficie contra *Mycoplasma hyopneumoniae* en tejidos linfoides y pulmón a la 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> semanas postinfección. Un dato significativo es que la presencia de anticuerpos coincide con la aparición de las lesiones neumónicas <sup>(16)</sup>.

En una infección con *Mycoplasma hyopneumoniae* se observa que la proporción de células que contienen IgA: IgG es de 1:3 en mucosa nasal y en ganglios retrofaríngeos, cambiando esta proporción a 1:15 en nódulos linfoides bronquiales. En estos nódulos 3 semanas postinfección se encuentran todos los isotipos de inmunoglobulinas pero sobre todo la clase IgG que aparece desde la primera semana <sup>(16)</sup>.

Se han estudiado las secreciones traqueobronquiales utilizando la técnica de ELISA encontrándose que las inmunoglobulinas IgM e IgG predominan en las primeras fases de infección mientras que la IgA va incrementándose progresivamente <sup>(16)</sup>.

Los anticuerpos séricos tienen un comportamiento diferente al observado en las secreciones bronquiales. Estos anticuerpos se detectan 5 semanas postinfección, siendo las IgG las más importantes detectadas por la técnica de ELISA.

Actualmente se ha desarrollado la prueba de ELISA Tween 20 que reduce al mínimo las reacciones cruzadas con *Mycoplasma flocculare*, teniendo también amplias

perspectivas para el monitoreo de datos particularmente en la detección de anticuerpos en calostro de cerdas <sup>(16)</sup>.

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 esta inmunidad es de corta duración ya que pueden desarrollar el proceso neumónico a los once meses después de una infección inducida <sup>(16)</sup>.

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 lipopolisacáridos que, cuando se asocian a proteínas ajenas a la membrana de *Mycoplasma hyopneumoniae*, son capaces de estimular la producción de anticuerpos. Se han comparado algunas cepas de *Mycoplasma hyopneumoniae*, encontrando una diversidad antigénica entre ellas, reveladas por pruebas de inmunolectroforénesis bidimensional. Los determinantes antigénicos son proteínas, glicolípidos y fosfolípidos que se localizan en la superficie celular <sup>(16)</sup>.

### 1.7 PATOGENESIS.

El período de incubación es de 10 a 16 días bajo condiciones naturales, la enfermedad se ha reportado en los cerdos de 2 a 10 semanas de edad, aunque por lo general se disemina lentamente y muchos cerdos no la evidencian, hasta que tienen entre 3 y 6 meses de edad <sup>(20, 44)</sup>. El cerdo infectado elimina aerosoles contaminados que pueden ser captados por el sistema respiratorio de un cerdo susceptible <sup>(21)</sup>. *Mycoplasma hyopneumoniae* coloniza el epitelio ciliado del área traqueal, bronquial y bronquiolar por medio de receptores glucolípidicos presentes en estas células <sup>(29 y 51)</sup>, donde puede permanecer por largos periodos y al parecer,

por medio de una proteína citotóxica produce la destrucción de las vellosidades respiratorias <sup>(43)</sup>; se encontró en *Mycoplasma hyopneumoniae* sitios específicos identificados como La, Lb y Lc . Además la colonización del tracto respiratorio implica una adhesina llamada P97; la actividad de esta proteína en el cilio de unión fue localizada con la terminación carboxilo, la cual incluye 2 regiones, R1 y R2 <sup>(31)</sup>. De esta manera se inicia una respuesta del organismo a través de una infiltración de células mononucleares, principalmente linfocitos, localizados peribronquialmente. Esta infiltración celular está mediada por un factor mitógeno proteico <sup>(37)</sup>. Al parecer esta respuesta tiene un efecto inmunosupresor ya que interfiere en la remoción bacteriana, que usualmente utiliza el sistema respiratorio como mecanismo de defensa, suprimiendo la inmunidad humoral por la inhibición de linfocitos y la inmunidad celular por la inhibición de la fagocitosis mediada por macrófagos. Una vez establecida la inmunosupresión, los agentes bacterianos como *Pasteurella multocida* tipo A, tipo D toxigénica, *Actinobacillus pleuropneumoniae* u otros, pueden generar una infección secundaria <sup>(20, 37, 44)</sup>.

### 1.8 SIGNOLOGIA.

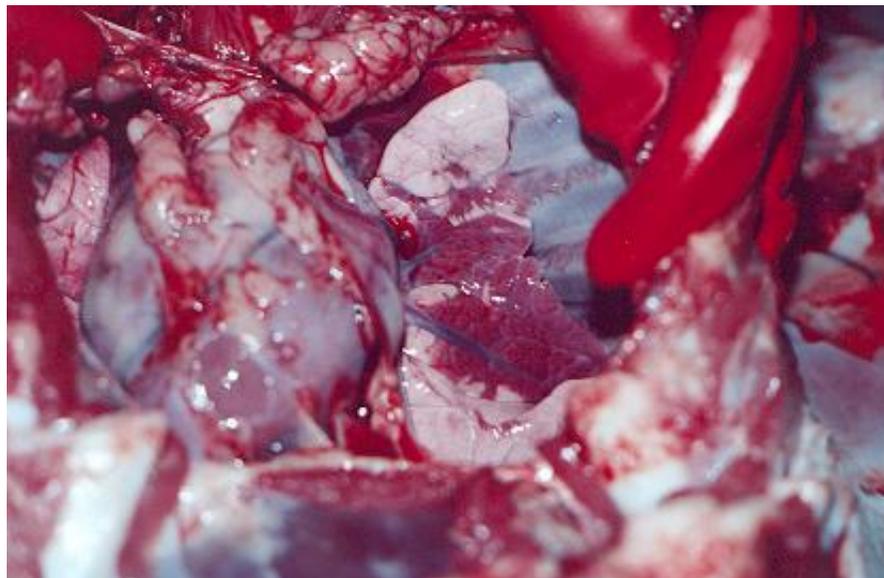
La manifestación clínica de la enfermedad respiratoria se puede iniciar cuando es destruido el epitelio ciliado del área traqueo-bronquial y ser más evidentes los signos cuando existe una infección bacteriana secundaria, sin embargo, los signos usualmente se presentan después de un proceso estresante como el destete, cambios bruscos de temperatura, sobrepoblación y ventilación inadecuada <sup>(20, 26)</sup>. Hay una alta morbilidad con una baja mortalidad y las manifestaciones son una tos crónica, seca y no productiva que se exacerba con el ejercicio y persiste por 3 semanas o más, también se observa dificultad respiratoria, pelambre hirsuto, estornudo, lo cual trae como resultado la reducción en la tasa de crecimiento, así como la disminución de la eficiencia alimenticia. Además los animales pueden permanecer deprimidos. La intensidad de la manifestación clínica es mayor en cerdos en la etapa de crecimiento y finalización, aunque se han reportado

manifestaciones desde las 3 semanas de la presentación de la enfermedad. Los movimientos respiratorios son normales a menos que el daño pulmonar sea extenso o se desarrolle una infección bacteriana secundaria. Las pérdidas por muerte asociadas con infección bacteriana y estrés pueden ocurrir entre los 4 y 6 meses de edad <sup>(2,5, 7, 9)</sup>.

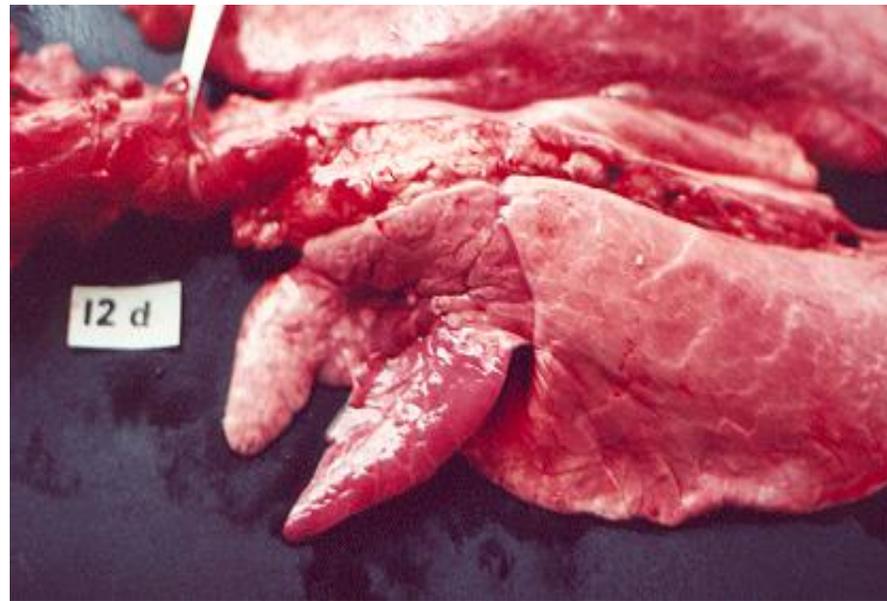
## **1.9 LESIONES.**

### **Lesiones macroscópicas:**

La mayor parte de las lesiones consisten en áreas de consolidación que van de color púrpura a gris, en estados crónicos tiene un parecido a un pulmón con atelectasia, Las lesiones están generalmente localizadas en las porciones craneo-ventrales del pulmón, afectando principalmente los lóbulos, apical, cardiaco, accesorio (intermedio), así como la parte anterior del lóbulo diafragmático, claramente demarcado del tejido normal, lo cual refleja una distribución broncogénica de la infección ( Fig 1 y 2). Los nodos linfáticos bronquiales y mediastínicos frecuentemente están aumentados de tamaño y puede existir presencia de exudado catarral en las vías aéreas <sup>(20, 26, 44)</sup>.



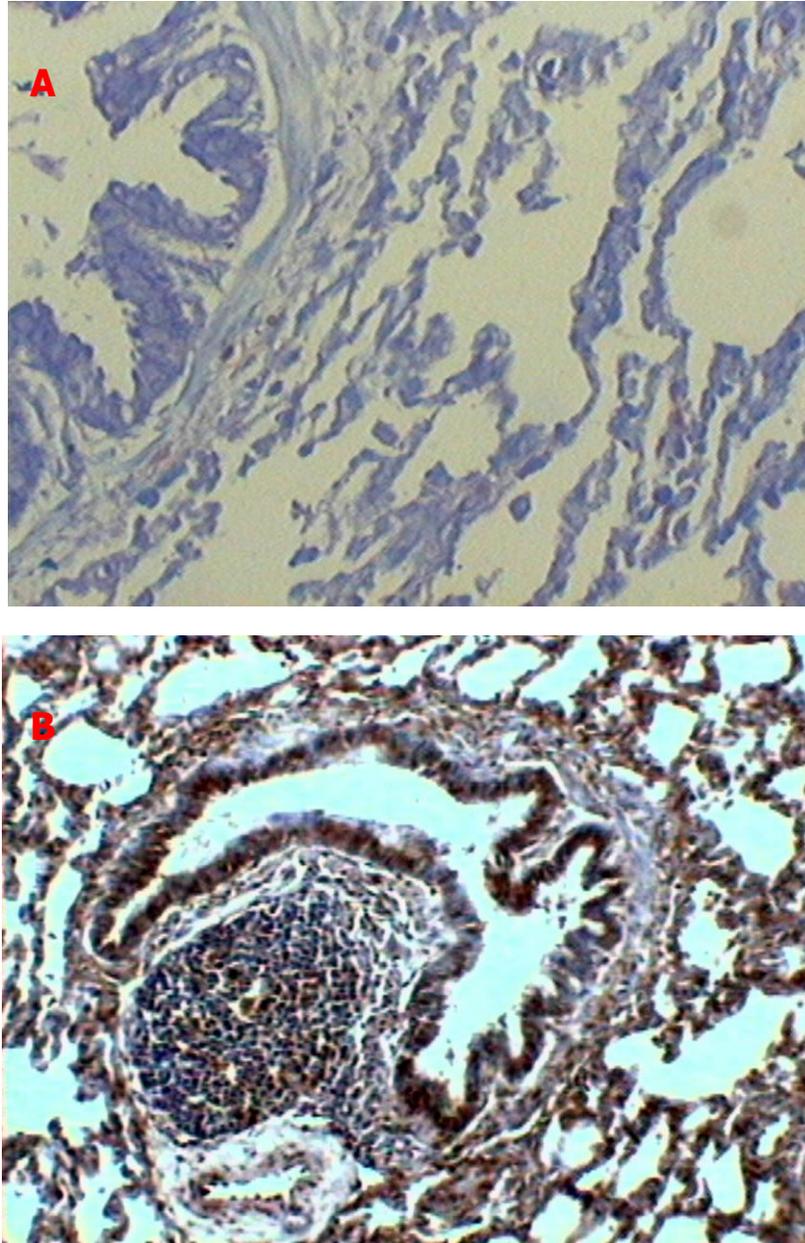
**Fig. 1** Ápice del lóbulo craneal mostrando consolidación violácea causada por *Mycoplasma hyopneumoniae*



**Fig. 2 Lesiones observadas en un cerdo inoculado con *Mycoplasma hyopneumoniae***

**Lesiones microscópicas:**

Se observa un aumento de los linfocitos en las áreas peribronquial, peribronquiolar, intersticial, perivascular y la presencia de células plasmáticas, además las paredes alveolares están engrosadas por congestión capilar y por el aparente incremento en el contenido celular con presencia de exudado debido a infecciones bacterianas secundarias, caracterizado por la presencia de polimorfonucleares. Muchos alvéolos contienen un edema eosinofílico que llega a cubrir grupos de polimorfonucleares, macrófagos, linfocitos y células plasmáticas. Al microscopio electrónico se han observado los micoplasmas entre los cilios del epitelio bronquial (figura 3) (7, 20, 26, 44).



**Fig.3. (A) Corte histológico de un pulmón normal (Azul de Toluidina). (B) Sección de pulmón infectado con *M. hyopneumoniae* donde se muestra la proliferación linfoblástica y formación de BALT (inmunohistoquímica para CD4<sup>+</sup> 10X)**

### **1.10 DIAGNOSTICO**

El diagnóstico presuntivo se realiza sobre la base de las condiciones epizootiológicas de la enfermedad, historia clínica, signología, lesiones a la necropsia y los resultados histopatológicos <sup>(19,24)</sup>, sin embargo la confirmación por pruebas de laboratorio es esencial, especialmente en esquemas de monitoreo, estas pruebas incluyen inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa, hemaglutinación indirecta (IHA), fijación de complemento (CF), la técnica de inmunoabsorción ligada a enzima (ELISA), siendo de mayor uso las tres últimas <sup>(19, 24, 39,48)</sup>. Sin embargo, el diagnóstico definitivo se logra por medio del aislamiento del microorganismo. En México el diagnóstico de campo de esta enfermedad se apoya únicamente de los signos clínicos, las lesiones macroscópicas y microscópicas en la gran mayoría de los casos <sup>(20, 26, 44, 54)</sup>. En el diagnóstico de laboratorio se utiliza la prueba de ELISA únicamente.

### **1.11 TRATAMIENTO.**

La infección por micoplasmas es difícil de eliminar por completo pero las manifestaciones clínicas de la neumonía enzoótica pueden ser reducidas por el tratamiento con ciertas drogas. La medicación en agua con tetraciclinas para prevenir la infección y el tratamiento con una mezcla de tilosina y sulfonamida soluble, se recomienda adicionar a los alimentos espectinomina o espiramicina y enrofloxaciona, las cuales pueden reducir la infección, aunque el sugerir esta vía de administración no siempre suele ser la óptima, ya que el espectro en el agua y alimento es reducido; por lo que actualmente es recomendable tratar inicialmente por inyección hasta observar completamente los signos de una infección por *Mycoplasma hyopneumoniae* <sup>(44, 50)</sup>.

Las lesiones pulmonares de neumonía enzoótica algunas veces son regresivas después del tratamiento pero no completamente eliminadas, aunque se observe una mejoría en la producción <sup>(44)</sup>.

La tiamulina, tetraciclina, tilosina y lincomicina ayudan a reducir la severidad de la presentación de la enfermedad pero no previene el establecimiento de la infección pulmonar, mientras que la oxitetraciclina y clortetraciclina sólo reducen la tos y mejora la condición de los animales, pero no las lesiones neumónicas <sup>(9,44)</sup>.

En la actualidad se emplean antibióticos como la enrofloxacin a razón de 2.5 mg/kg I.M. ó combinaciones de tianfenicol y tilosina por vía intramuscular (10 y 4 mg/kg respectivamente) <sup>(32, 52)</sup>.

### 1.12 CONTROL Y PREVENCIÓN

Se han hecho esfuerzos para controlar la enfermedad que afecta económicamente de manera importante debido a la relación producción-alimento. Se ha tratado de prevenir la presentación de la enfermedad por medio de vacunas, actualmente los laboratorios comerciales con ayuda de cepas de alta reproducción y la optimización de medios de cultivo que, aunados con nuevos análisis antigénicos y de virulencia asociados a la adhesión preparan el camino para vacunas más refinadas <sup>(29)</sup>.

Otras alternativas son la repoblación con cerdos nacidos por histerectomía (aunque resulta un método alto en costos y poco práctico) o una medicación en sistemas de destete temprano y separados de animales infectados <sup>(50)</sup>.

Los programas de cerdos libres de patógenos específicos tiene un éxito parcial en la erradicación de *Mycoplasma hyopneumoniae* ya que 75 % de estas piaras pueden ser re infectadas después de 5 años de establecidas <sup>(50)</sup>.

Las medidas en que se debe poner énfasis para controlar la neumonía enzoótica incluyen:

- Sistemas de manejo: todo dentro/todo fuera.
- Partos sin intervención ó "Isowear" (este sistema ha tenido buenos efectos en USA y Canadá).
- Granjas de tres sitios.
- Manejo de excretas.

- Evitar el traslado innecesario de los animales dentro de la misma granja para disminuir el estrés.
- Alimentación sólida con suficiente espacio en el comedero disminuye las infecciones por neumonías.
- Factores sociales y de población como son la edad, el tamaño de la piara, los grupos, las dimensiones de los corrales.
- Densidad del medio, cuando la densidad se incrementa, también las neumonías.
- Espacio aéreo, cuando es menos de  $3\text{m}^3$  /cerdo existe un mayor número de neumonías.
- Espacio de suelo, menos de  $0.5\text{ m}^2$  de piso por cerdo se asocia más con elevados niveles de enfermedades recurrentes <sup>(50)</sup>.

## **2. CAPITULO II**

### **2.1 CLASIFICACION TAXONOMICA.**

REINO: *Procariota*.

PHYLUM O DIVISION: *Scotobacteria*.

CLASE III: *Mollicutes*.

ORDEN: *Mycoplasmatales*.

FAMILIA I.- *Mycoplasmataceae*: Requieren esteroides para su crecimiento; genoma  $5.0 \times 10^8$  Daltons; no hidrolizan urea; oxidación del NADH localizado en citoplasma.

-GENERO I: *Mycoplasma* (64 especies).

ESPECIE: *Mycoplasma hyopneumoniae*

-GENERO II: *Ureoplasma* (2 especies).

FAMILIA II.- *Acholeplasmataceae*: No requieren esteroides para su crecimiento; genoma de  $1.0 \times 10^9$  Daltons; oxidación del NADH localizada en membrana.

-GENERO I: *Acholeplasma* (7 especies).

FAMILIA III.- *Spiroplasmataceae*: Organismos helicoidales en algunas etapas de crecimiento; requiere esteroides para crecer; genoma de  $1.0 \times 10^9$  Daltons; oxidación NADH localizado en citoplasma.

-GENERO I: *Spiroplasma* (3 especies).

### **2.2 MEDIOS DE CULTIVOS PARA MICOPLASMAS.**

*Mycoplasma hyopneumoniae* es uno de los microorganismos mas delicados del género *Mycoplasma*. En algunos laboratorios, el aislamiento de micoplasmas en un procedimiento de rutina, que requiere de aproximadamente de 2 a 6 semanas para hacerlo. Esto es debido a que *M. hyopneumoniae* crece lentamente y es enmascarado por otros microorganismos de rápido crecimiento como *M. hyorhinis*. Se han ideado una variedad de medios de cultivo para el aislamiento de *M. hyopneumoniae*, a pesar de eso, solo son modificaciones del medio de Friis. (Friis, 1969; 1971a; 1971b; 1977)

**MEDIO SP-4**

El SP-4 es un medio enriquecido que utiliza en el cultivo de cepas de *Spiroplasma*, ha sido utilizado principalmente además para el aislamiento de *Mycoplasma pneumoniae* de exudados faríngeos y para el aislamiento de nuevos micoplasmas presentes en el tracto genital; Tully *et al.* Han reportado una mejora en el aislamiento de *M. Hominis* (Fiacco. 1984). Los porcentajes de recuperación de una cepa sembrada en medio SP-4, con y sin modificaciones son arriba del 90% <sup>(22)</sup>

En los últimos años <sup>(45)</sup> el SP-4 se ha utilizado como medio de primoaislamiento para micoplasmas. En un medio modificado de SP-4 (SP4-II) se aisló *Mycoplasma hyopneumoniae* de pulmón, mediante el uso de hisopos estériles, los cuales fueron sumergidos en un tubo con 2 ml del medio líquido SP4-II e incubados en agitación a 37°C y cultivados por los medios rutinarios para bacterias y hongos <sup>(45)</sup>.

En experimentos <sup>(45)</sup> se propuso hacer subcultivos en medio sólido SP4-II incubados a 37°C en una atmósfera de ambiente humedecido y se leyeron en base a la morfología de las colonias de *Mycoplasma hyopneumoniae*, el cual fue distinguido de *Mycoplasma hyorhinis* usando pruebas químicas rutinarias; para comprobar la pureza de los aislamientos corrieron inmunoperoxidasa indirecta usando anticuerpos monoclonales, el resultado se consideró positivo cuando se observó la marca de fluorescencia en las microcolonias <sup>(45)</sup>.

SP4 urea demuestra niveles aceptables de recuperación del microorganismo comparado con otros medios. Por otra parte para *Mycoplasma pneumoniae*, es muy conveniente en forma líquida con solo hisopados se puede aislar hasta un 64.7% para resiembra en el medio SP4-II.

### PREPARACIÓN DEL MEDIO SP4

El medio SP4 es altamente nutritivo debido a la infusión carne-corazón, peptona suplementada de extracto de levadura, medio 1066 CMRL y suero fetal bovino. El extracto de levadura provee difosfonucleótidos (difosfopiridina), el suero provee colesterol y fuente de proteína, los sustratos específicos (glucosa, arginina, urea) son adicionados y junto con el pH final del medio preparado, sirven para diferenciar y seleccionar diversos Micoplasmas. Anfotericina B, polimixina B y penicilina inhiben el crecimiento rápido de contaminantes.

### FORMULA

Ingredientes para 690ml de agua desionizada.\*

SP4 Caldo simple\*\*:

-Caseina pancreatica digestiva	10.0gm
-Gelatina pancreatica digestiva	5.0gm
-Caldo PPLO sin CV	3.5gm
-Polimixina B	50.0mg
-Anfotericina B	5.0mg
-Suero fetal bovino	170.0ml
-Medio 1066 CMRL	(10X) 50.0ml
-Extracto de levadura	35.0ml
-Levadurato 10%	20.0ml
-Penicilina	1000000 U

Ingredientes que se pueden adicionar:

SP4 Agar con glucosa

-Agar	9.0gm/L
-Glucosa	5.0gm/L

SP4 Caldo con Arginina\*\*

-Arginina	5.0gm/L
-----------	---------

SP4 Caldo con Urea\*\*

-Urea 1.0gm/L

SP4 Caldo Básico\*\*

\*\*Que todos los medios del caldo contienen:

-Rojo de fenol 18.0gm/L

El pH final a 25°C para el medio SP4 deberá ser el que a continuación se menciona

SP4 Caldo simple

7.0 +/- 0.2

SP4 Caldo con Arginina

SP4 Agar con Glucosa

7.4 +/- 0.2

SP4 Caldo con Glucosa

SP4 Caldo con Urea 6.0 +/- 0.2

\*Ajustar o suplementar como se requiera a criterio.

#### ALMACENAMIENTO Y VIDA DE ANAQUEL

Se debe guardar el medio de 2-8°C lejos de la luz directa del sol, no debe ser usado si muestra signos de deterioro (disminución de la cantidad, formación de piedras, decoloración, hemólisis o contaminación) o bien, si la fecha de caducidad ha vencido. El producto es sensible a la luz y temperatura excesiva o muy baja, así como de la humedad, tampoco debe congelarse.

La fecha de caducidad aplica al producto aún en su almacenamiento intacto, cuando se ha guardado como se menciona. Este producto tiene vida de

almacén de acuerdo a la fecha de manufactura.

90 días: SP4 Agar con Glucosa

120 días: SP4 Caldo simple, SP4 caldo con arginina, SP4 caldo con glucosa, SP4 caldo con urea.

### **PRECAUCIÓN**

Uso exclusivo para diagnóstico in vitro, revise las medidas de riesgo y técnicas de asepsia, debe ser usado solo por personal de laboratorio adecuadamente entrenado y calificado, esterilizar todos los desechos riesgosos después de su uso.

### **PROCEDIMIENTO**

Colección de especímenes: el espécimen o hisopo debe ser colocado en un transporte perfectamente sellado y con suficientemente medio de transporte para evitar la desecación, las muestras deben llevarse directamente al laboratorio y procesarlas lo más pronto posible, si hubiera un retraso en el cultivo, la muestra debe refrigerarse. Para almacenado de largos periodos o si los cultivos no pueden ser preparados dentro de las 24 horas post colección asegure las muestras a – 70 °C en un crío preservador (Tissue-Tek) o brucella con glicerol. No congelar a temperaturas mayores a – 70 °C.

### **SP4 AGAR**

Si se usa un inóculo líquido, añadir 0.1ml de líquido a la superficie del agar y distribuirlo uniformemente moviendo la placa moderadamente de atrás hacia adelante para diseminar el inóculo o podemos distribuirlo con un asa estéril Si se cultiva directamente de un hisopo, ruede el hisopo sobre la superficie del agar para aislamiento, para asegurar incrementar la recuperación puede ser mediante dilución y adición de la muestra con diluciones seriadas de  $10^{-3}$ . Diluyendo la muestra se minimiza el efecto de los inhibidores en el crecimiento de Micoplasmas.

Tapar la caja del agar para disminuir la deshidratación incubar a 35 °C con 5-10% de CO<sub>2</sub> por arriba de 30 días, cajas invertidas y examinar a 40X, 60X en el

microscopio para observar pequeñas colonias finas que penetran en la superficie del agar; Las colonias de *Mycoplasma hominis* son de 20-300mm de diámetro; las colonias de *Mycoplasma hyopneumoniae* carecen de la protuberancia central que les da aspecto de huevo frito.

### **SP4 CALDO**

Inocular en el caldo 0.1 ml con el medio de transporte que contiene a la toma de muestra, el caldo puede ser inoculado también mediante diluciones de 1:10 con sangre o solución salina fisiológica. El tejido de la muestra puede ser inoculado colocando fragmentos pequeños directamente en el caldo. Se puede incrementar la recuperación mediante dilución en serie hasta  $10^{-3}$ . Diluyendo el espécimen se minimizan los efectos inhibitorios bacterianos en el crecimiento de micoplasma.

Cerrar perfectamente el tubo e incubar el caldo inoculado aeróbicamente a 35°C hasta por más de 30 días, examinar los tubos diariamente para constatar cambios en el pH por el vire de los indicadores incluidos en el medio. Tan pronto se observe un cambio en el pH crear un subcultivo del caldo a un agar apropiado.

### **INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

#### **AGAR SP4**

Micoplasma aparece como pequeñas colonias con forma de huevo frito o colonias finas con aspecto de mora que penetran la superficie del agar. Dichas colonias tienen un rango de 20-30mm de diámetro dependiendo de la especie.

#### **SP4 CALDO**

El crecimiento de micoplasma en SP4 con glucosa lo hará tornarse de su color original rojo a color amarillo.

El crecimiento de ureoplasma en SP4 con urea se tornará de amarillo-naranja al rojo.

El crecimiento de micoplasma en SP4 con arginina cambia el medio de naranja a rojo.

**LIMITANTES**

Pueden presentarse inconsistencias ocasionales en el crecimiento de la bacteria en el medio, puede haber similitud entre las formas L y micoplasmas, además puede causar confusión porque ambas exhiben colonias de huevo frito que penetran la superficie del agar.

Las colonias de forma L tienden a ser más grandes y con superficie más rugosa, muchas formas L pueden revertir a su forma bacteriana si son pasadas o inoculadas en un medio libre de penicilina.

**CONTROL DE CALIDAD**

Los siguientes organismos son usados para probar los medios comerciales, y es recomendable utilizar controles positivos y negativos que validarán los resultados que se obtengan en el laboratorio de diagnóstico.

<b>Organismos a probar</b>	<b>Método de inoculación*</b>	<b>Incubación Tiempo</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Atmósfera</b>	<b>Resultados</b>
<b>SP4 caldo simple: (los organismos siguientes se inoculan a todos los medios enumerados abajo)</b>					
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	*	24hr	35°C	Aerobio	Inhibido
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	*	24hr	35°C	Aerobio	Inhibido
<i>Candida albicans</i> ATCC® 10231	*	24hr	35°C	Aerobio	Inhibido
<b>Agar SP4 con glucosa:</b>					
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> ATCC® 15531	*	3-20 días	35°C	** CO2	Crecimiento; aparece como colonias minúsculas de "huevo frito" o como colonias finas aspecto de mora que penetran la superficie del agar, el medio cambia de su rojo original al amarillo

<i>Mycoplasma arginini</i> ATCC® 23838	*	3-20 días	35°C	Anaerobio	Igual que <i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<b>Caldo SP4 con Arginina:</b>					
<i>Mycoplasma hominis</i> ATCC® 23114	*	1-4 días	35°C	Aerobio	Crecimiento; cambio del color del medio de su naranja original al rojo, es apropiado para subcultivo en un medio de agar
<b>Caldo SP4 con urea:</b>					
<i>Ureoplasma urealyticum</i> ATCC® 27618	*	1-4 días	35°C	Aerobio	Crecimiento; cambio en el medio del original amarillo-naranja al rojo, es apropiado para subcultivo en un medio de agar
<b>Caldo SP4 con glucosa:</b>					
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> ATCC® 29085	*	3-20 días	35°C	Aerobio	Crecimiento; cambio del medio del rojo original al amarillo, es apropiado para subcultivo en un medio de agar

\*Método de inoculación; usar el mas apropiado para cada microorganismo.

\*\* La atmósfera de incubación es enriquecida con 5-10 % de CO<sub>2</sub>.

ATCC. Es un catálogo que provee microorganismos de puros y certificados.

Control de calidad del usuario

Checar signos de contaminación y deterioro. El uso de medios comerciales preparados requiriere realizar el control de calidad que utiliza al menos un microorganismo conocido deseado para demostrar crecimiento o una reacción positiva; y por lo menos un organismo indeseable para demostrar la inhibición o una reacción negativa (cuando sea aplicable).

**MEDIO DE FRIIS.**

Este medio es que se ha utilizado de manera rutinaria en los laboratorios de diagnóstico.

Solución Salina Balanceada Mod. de Hanks	304.0 ml.
Infusión Cerebro Corazón	5.0 g.
PPLO Caldo (Difco)	5.2 g.
Rojo de Fenol (Sol 0.2%)	7.0 ml.
Agua Desionizada( calidad para cultivo celular)	1170. ml.

Disolver y esterilizar a 15psi/ 15 min., en una olla de presión que contenga agua desionizada. Posteriormente mantenerla de 45- 50° C en baño María, para agregarle en forma aséptica a los siguientes compuestos estériles:

Extracto de levadura	60.0 ml.
Suero de cerdo ( 56°C /30 mins)	165.0 ml.
Suero de caballo	165.0 ml
Bacitracina(5000 U/ml)	2.9 ml
Meticilina ( 100mg/ml)	2.5 ml
Rojo de fenol ( solución al 0.5% )	4.5 ml

Ajustar el pH a 7.4 con una solución al 7.5% de bicarbonato de sodio. El medio ya preparado se distribuye en tubos de 3 x 100 mm con tapón de baquelita a razón de 4.5 ml en cada uno (\*), Se esterilizó en autoclave.

**Medio Sólido de Friis:**

Infusión cerebro corazón (BHI,Difco) .....	5.00 g
PPLO caldo (Difco).....	5.00 g
Rojo de fenol (sol. 0.2%).....	7.00 m
Agar noble (Difco).....	9.00 g
DNA.....	0.02 g
Agua desionizada.....	450.00 ml

Ajustar el pH con una solución 0.1 N de NaOH y esterilizar en el autoclave manteniéndose a 45-50°C en baño maría para agregarle en forma aséptica los siguientes compuestos:

Sol. Salina balanceada mod. de Hank .....	304.00 ml
Extracto de levadura.....	36.00 ml
Suero inactivado de caballo.....	250.00 ml
Meticilina.....	150.00 mg
Sulfato de kanamicina.....	1.00 mg/ml

Mezclar y distribuir en cajas de Petri de 100 mm de diámetro

#### SOLUCIÓN SALINA BALANCEADA MODIFICADA DE HANKS.

Disolver en el orden que se presenta.

Solución de Stock "A":

NaCl	80.0 g.
KCl	4.0 g.
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	1.0 g.
MgCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O	1.0 g.
Agua Destilada	400.0 ml.
CaCl <sub>2</sub>	1.4 g.
Agua destilada hasta	500.0 ml.

Solución de Stock "B":

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -12H <sub>2</sub> O	1.5 g.
Agua destilada	400.0 ml.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.6 g.
Agua destilada	500.0 ml.

Al momento de su uso, 25 ml. de la solución stock "A" se mezclan con agua destilada hasta 400 ml. después se agregan 25 ml. de la solución stock "B" y se completa con agua destilada hasta 500 ml. Se ajusta el pH con NaOH 1 N hasta 7.6 y se mantiene en refrigeración hasta su uso.

**EXTRACTO DE LEVADURA.**

Suspender 50 gramos de levadura fresca de panadería en 100 ml. de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2M.

Calentar de 80-85° C durante 20 minutos.

Clarificar por filtración o por centrifugación.

Ajustar el pH a 7.6 con NaOH 1N.

Esterilizar por filtración.

Almacenar a -20° C.

**SOLUCIONES.**

Solución Amortiguadora de Fosfatos (0.01 M con pH de 7.2).

<b>Solución A</b>	$\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$	1.38 g.
	NaCl	8.5 g.
	Agua destilada cbp	1000 ml.

<b>Solución B</b>	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	1.42 g.
	NaCl	8.5 g.
	Agua destilada cbp	1000 ml.

Mezclar 280 ml de solución A con 70 ml de solución B.

**2.3 TINCIÓN DE LAS COLONIAS DE MICOPLASMAS.**

Las colonias con característica de "gotas de rocío" se observan con el microscopio estereoscópico (25X) y se tiñen por el método Dienes. Esta tinción se realiza con el objeto de hacer manifiesta la presencia de las colonias de micoplasmas, así como la eliminación de artefactos y formas "L" de bacterias (18).

**TINCIÓN DE DIENES**

Tinción de Dienes:

- Azul de metileno.....2.5 g.
- Azur II.....1.25 g.
- Maltosa.....10.0 g.
- Carbonato de sodio.....0.25 g.
- Acido Benzoico.....0.2 g.
- Agua destilada.....cbp 100 ml.

Depositar los diminutos bloques sobre el portaobjetos y teñir durante 1-2 minutos con la solución colorante de Dienes.

Las colonias de micoplasmas se tiñen de color azul oscuro en el centro, donde las colonias están embebidas en el agar, y de azul claro en la periferia. Los organismos no viables o bien no se tiñen o toman color rosado o violeta <sup>(18)</sup>.

**TINCIÓN DE GIEMSA.**

Aunque los micoplasmas se clasifican como gram negativos se tiñen mal con tinción de Gram, por lo que también se utiliza la tinción de Giemsa.

**Solución madre de Giemsa**

- Polvo de Giemsa.....1 gr.
- Glicerina..... 66 ml.
- Metanol.....66 ml.

- En un frasco ámbar (libre de ácidos) se coloca el polvo de Giemsa y se le adiciona la glicerina.
- Se lava la glicerina restante (residual) con el metanol.
- Se tapa y envuelve en aluminio.
- Se coloca la botella en el "mezclador de rotación" y se deja mezclar durante 3 días.

**Solución amortiguadora de Giemsa (5X) pH 6.5-6.6**

Fosfato de sodio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ).....19.10 g.

Fosfato de sodio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ ).....30.90 g.

Mezclar las sales en 400 ml de agua destilada y disolver bien.

Adicionar 100 ml de alcohol etílico al 95 %.

Procedimiento:

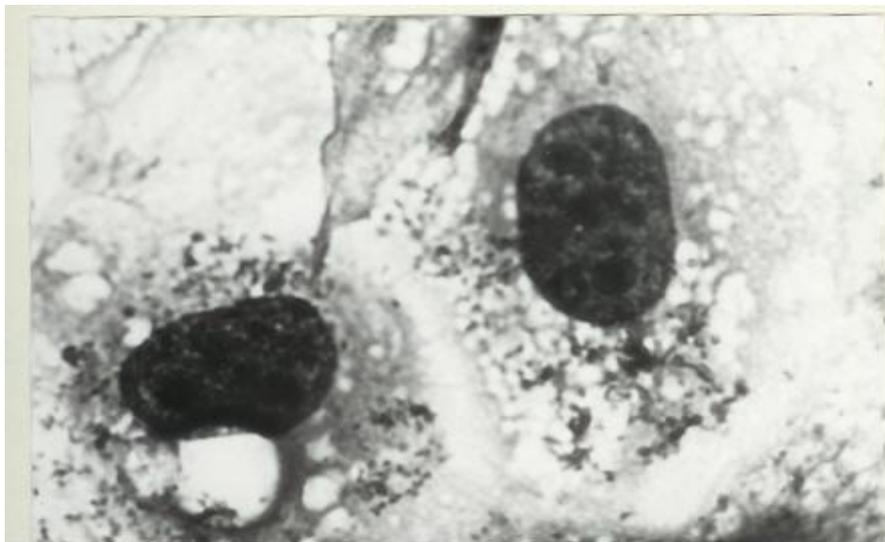
Fijar los frotis en metanol de 5-10 minutos.

Deshidratar durante 5 minutos en etanol de 70-50 %; lavar con agua destilada.

Tratar con solución amortiguada de fosfatos con pH 6.5 durante 5 minutos.

Teñir con solución Giemsa en dilución 1:10 en solución amortiguada de fosfatos 0.1 M con pH de 6.5 de 15-20 minutos.

Lavar con agua destilada, secar y montar las preparaciones (figura 4).



**Fig.4** Cultivo celular infectado de *M.hyopneumoniae*, se observan vacuolas y muchos micoplasmas en el citoplasma.(Cortesía Dr. Pijoan).

**CAPÍTULO III.**

**TOMA Y ENVÍO DE MUESTRAS**

**3.1 TOMA DE MUESTRAS**

La toma de muestras es el paso de mayor importancia para cualquier técnica de identificación bacteriana, por eso es necesario llevar a cabo una selección adecuada de la cual se obtengan cortes de tejidos para su estudio histológico o histopatológico y de esta manera apoyar el diagnóstico de las diversas enfermedades a las que están expuestos los animales<sup>(1,38)</sup>.

Las muestras se seleccionan previamente en base a la enfermedad o servicio que se solicite, de tal forma que estén orientadas a ahorrar tiempo, material y esfuerzo, logrando así un beneficio mutuo entre el interesado en obtener el resultado y el laboratorio de diagnóstico. Se debe considerar que la toma de muestras se lleve a cabo de un caso clínico representativo de la enfermedad o enfermedades e presentes en el hato.

Se seleccionan para tomar muestras; animales vivos en estado avanzado de la enfermedad, o de los animales muertos recientemente siempre y cuando no se encuentren en estado de descomposición. Como el factor económico es una limitante y la infección por *Mycoplasma hyopneumoniae* tiene un porcentaje de mortalidad muy bajo o nulo entre los cerdos, se sugiere que las muestras se tomen de animales que se destinen al abasto en el momento del sacrificio, desde luego si presentan la signología clínica sugestiva de Neumonía Enzoótica y las lesiones macroscópicas coincidan con la misma, dicha sinología y lesiones se mencionan en el capítulo I.

Es necesario hacer llegar una historia clínica completa al laboratorio de diagnóstico para ampliar el panorama y que el diagnóstico sea más preciso<sup>(38)</sup>, así como proporcionar una idea clara de las condiciones ambientales en las que se encuentran los animales, por tanto deberá constar de los siguientes datos:

Nombre del propietario.

Persona que envía el caso.

Nombre de la granja, rancho o explotación, así como su localización.

Descripción de los animales: especie, raza, sexo, edad, etc.

Identificación de cada animal: aretes, muescas, tatuajes, etc. Si pertenece a un lote específico (destete, desarrollo, engorde, reproductores, etc.).

Medio ambiente:

Macroclima: Condiciones geográficas y climatológicas de la región.

Microclima: Instalaciones (material de construcción, condiciones, dimensiones, espacio por animal).

Alimentación:

Tipo de alimentación, si es comercial, marca, desperdicios y cantidad suministrada.

Bebedores: cisterna, pozos, tanques y si se cuenta con clorinador.

Posibilidad de contacto con animales de explotaciones vecinas.

Medicina preventiva: vacunas, desparasitaciones, frecuencia.

Muestra: método de sacrificio, hora y fecha en que se sacrificó el animal, y en que forma fue tomada la muestra, tipo de conservador usado.

Diagnóstico presuntivo.

Recuerde contar con el material indispensable a la hora de tomar la muestra y usar exclusivamente el que a continuación se sugiere:

Charola (adecuada al tamaño del órgano del que se tomará la muestra)

Guantes estériles

Tijeras de punta roma

Crioprotector (Tissue-Tek)

Viales color ámbar

Termos: uno a 20 °C y otro a 4 °C

Pinzas de disección sin dientes



Fig. 5 Material indispensable para obtener especímenes para diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae*

### 3.2 OBTENCIÓN DEI ESPECIMEN

Es necesario llevar una secuencia de pasos para la obtención del espécimen, con el fin de garantizar la integridad del mismo <sup>(1)</sup>, tome en cuenta las siguientes consideraciones, ya que de estas depende el éxito a la hora de procesar las muestras en el laboratorio de diagnóstico.

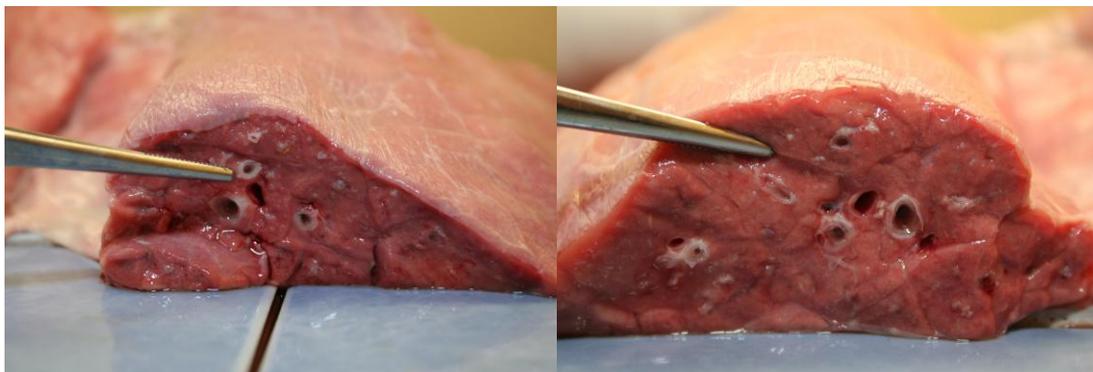
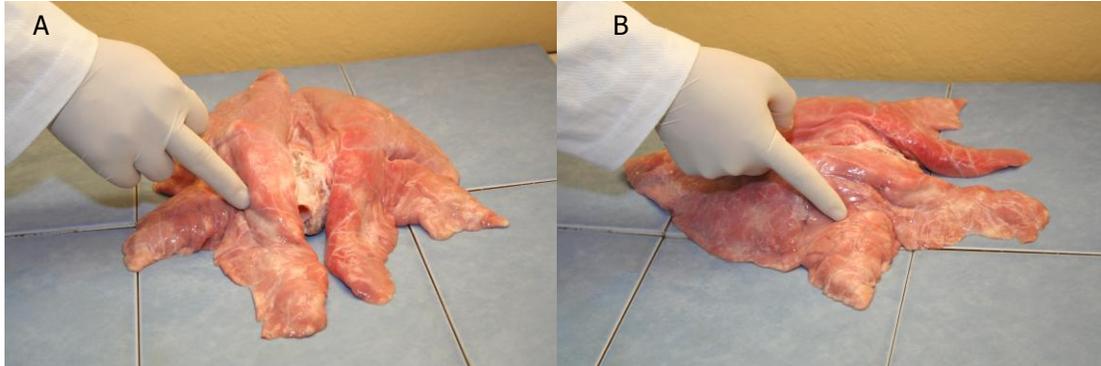


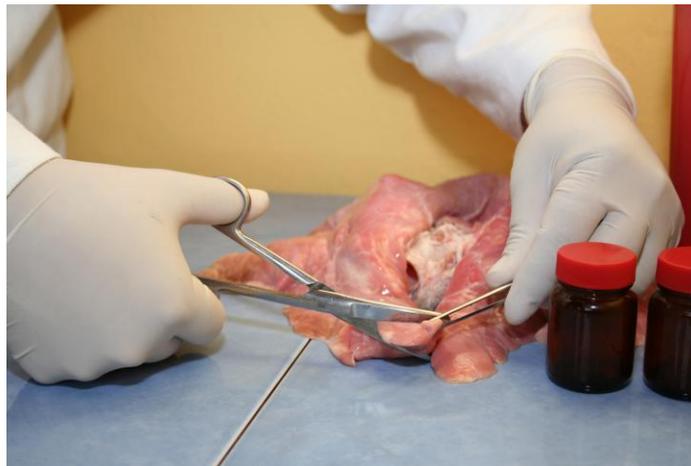
Fig. 6 *Mycoplasma hyopneumoniae* se encuentra alrededor de los bronquios principales, es indispensable tomar muestra del área señalada.

1. Los pulmones deben estar libres de sangre, se colocan extendidos en la charola y se inspeccionan los lóbulos apicales para detectar lesiones presuntivas de *Mycoplasma hyopneumoniae*.



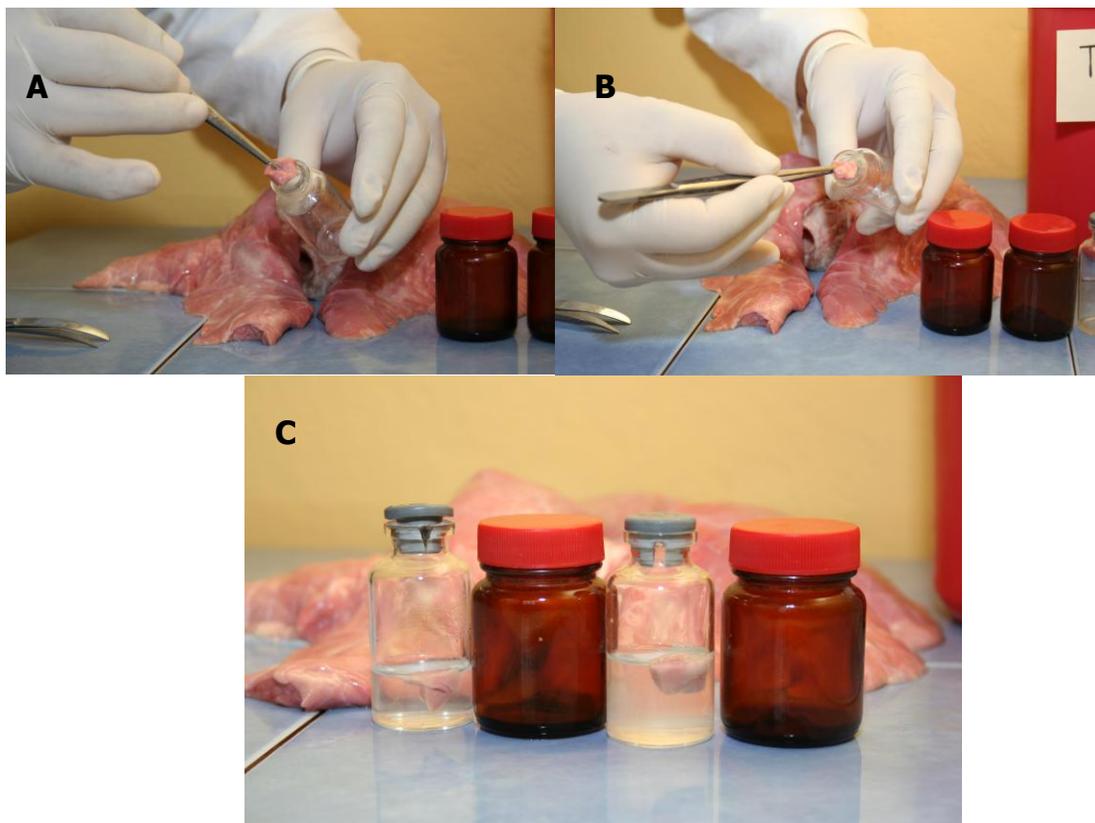
**Fig.7 Pulmones extendidos, libres de sangre con lesiones discretas de Neumonía enzoótica. A) Vista frontal de la lesión en el lóbulo apical derecho, B) vista lateral de la misma lesión**

2. Corte muestras de 1cm<sup>3</sup>, recuerde hacerlo con tijeras de punta roma (no sustituir por bisturí, para evitar lesionar el tejido), procure obtener una parte sana y una parte lesionada en la misma muestra y de preferencia obtenga 2 muestras por si así lo requiere el laboratorio. La muestra debe evidenciar al bronquio y la lesión por arriba de este.



**Fig. 8 Corte del ápice pulmonar con tijeras de punta roma sin óxido ni contaminantes en las hojas**

3. Perfundir el tejido con el crioprotector, introducir en el vial y agregar suficiente crioprotector para cubrir totalmente el tejido.



**Fig. 9** El tejido se cubre en su totalidad con el crioprotector desde el momento en que se hace el corte A) espécimen cubierto de crioprotector. B) el vial contiene suficiente crioprotector y es introducida la muestra. C) la muestra es totalmente cubierta con crioprotector.

4. Colocar el vial en el contenedor a 20 °C, espere de 20 a 30 minutos y pase el vial al contenedor a 4 °C. Es conveniente que la muestra se envíe inmediatamente al laboratorio, pero si no es posible procure que la muestra se congele a -20 °C, ya que la temperatura ideal para poder hacer los cortes es a -25 °C<sup>(1)</sup>.



**Fig. 10 A) contenedor que baja la temperatura de 20 a 4°C. B) el contenedor a 4°C debe identificarse correctamente para su envío y pronto procesamiento**

5. Se pide verificar la temperatura de los contenedores y ser preciso en el tiempo que están los viales dentro de los mismos, debido a que los cambios bruscos de temperatura dan origen a cristales que desgarran el tejido.

Nota. Procurar no lesionar demasiado el tejido, para evitar confusiones.

### **3.3 ENVIO DE MUESTRAS**

El medio más eficaz para el envío de muestras al laboratorio de diagnóstico es la mensajería especializada, mensajero directo o personalmente <sup>(1,38)</sup>, pero como esto no siempre es posible, se hace uso del servicio postal, donde desconocen totalmente que en algunos de los casos las muestras son potencialmente infecciosas, o bien, que su manejo debe ser delicado. A fin de evitar riesgos y pérdida de material, se deben tomar algunas consideraciones como las que a continuación se mencionan:

Tome en cuenta el tiempo en que llegará la muestra al laboratorio, para utilizar el conservador más adecuado. Pregunte al servicio de mensajería el tiempo que tardara en llegar la muestra a su destino. Estos son algunos de los conservadores más utilizados en bacteriología y la duración de su función:

Refrigeración. 24-48 horas, es uno de los métodos más efectivos para exámenes bacteriológicos, se utiliza hielo natural colocando el espécimen en un recipiente a prueba de fugas de agua y este a su vez se coloca en otro recipiente con las mismas características, pero de mayor tamaño para que el espacio que quede entre ambos sea llenado con fragmentos de hielo.

Hielo seco. 24 horas, empleándolo adecuadamente evita la descomposición de las muestras, en estos casos el mejor recipiente es la caja de cartón aislado o el unigel con una pequeña salida para el gas que desprende este conservador. La muestra no debe estar en contacto directo con el hielo ya que el CO<sub>2</sub> que se desprende afecta la viabilidad de las bacterias aerobias, tampoco deben utilizarse recipientes de metal o vidrio hermético, debido a que la presión generada al volatizarse el sólido puede provocar una pequeña explosión.

Las horas de conservación pueden variar dependiendo el clima de la región donde se tomaron las muestras.

La muestra que se manda, debe de ir acompañada de una etiqueta en el frasco, contenedor, vial o tubo de ensaye, para identificar a que animal corresponde.

Procure que las muestras lleguen al laboratorio los primeros días de la semana, no las envíe en fines de semana ni días festivos, recuerde que los servicios de mensajería refieren el tiempo de entrega en días hábiles.

Colocar las muestras en recipientes dobles, por ejemplo; una caja dentro de otra, o bien una bolsa de plástico dentro de una caja, de esta forma mejorará el aislamiento y se incrementará la resistencia del vial que contiene la muestra. Entre los viales que mande puede colocar material que amortigüe los golpes y absorba la humedad, tales como papel o aserrín. La caja externa se puede asegurar y hacer más resistente sellando con cinta adhesiva todas las esquinas y tapas<sup>(38)</sup>.

Exteriormente, la caja debe contener los siguientes datos:

- Nombre y dirección del destinatario.
- Datos del remitente: nombre, domicilio, teléfono, etc.
- Nombre del médico.
- Mencionar el conducto por el cual se prefiere que el laboratorio mande los resultados.
- Es necesario etiquetar dando una explicación del contenido ("Urgente", "Precaución", "Material congelado", etc.).
- Tipo de muestra (órgano, exudado, tejido, etc.).
- Datos generales del animal: especie, raza, sexo.
- Identificación: número de arete, tatuaje, muescas, etc.
- Lote, peso u etapa a la que pertenece (gestación, engorde, lactación, etc.).
- Diagnóstico presuntivo.
- Pruebas de laboratorio que solicita.
- Fecha de la toma de muestra.
- Fecha de envío de la muestra.

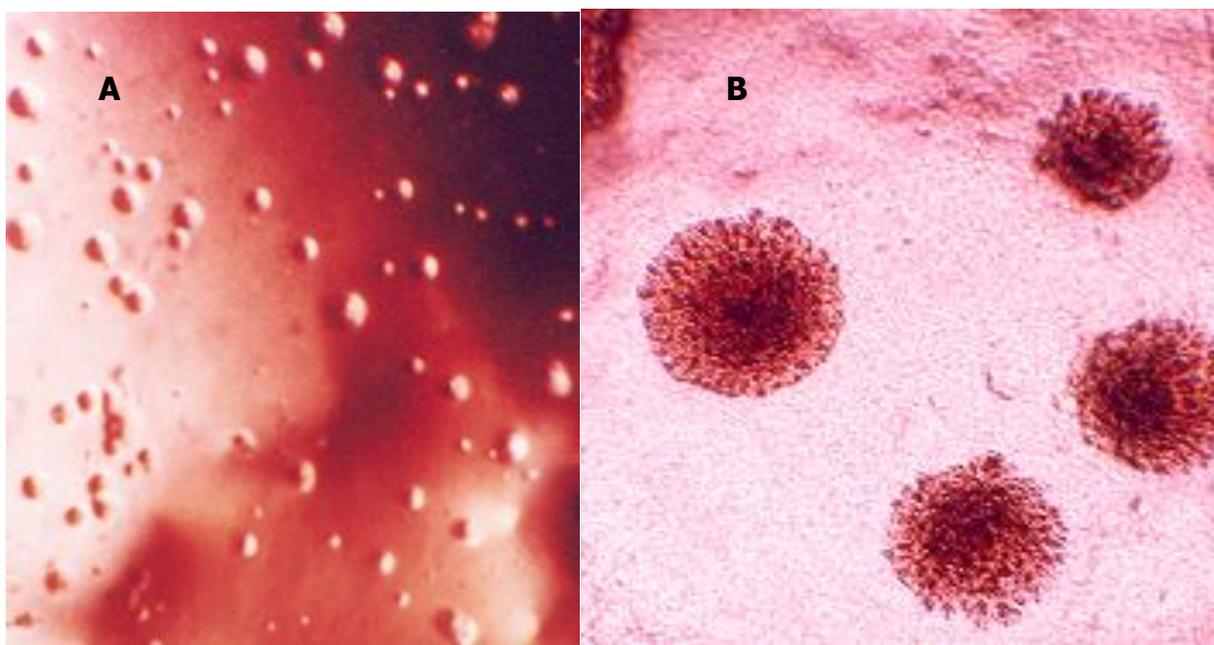
### **3.4 PROCEDIMIENTO DE AISLAMIENTO DE MICOPLASMAS DE LAS MUESTRAS PULMONARES .EN EL LABORATORIO**

**Pasos:**

- 1) Se toma el pulmón de cerdo con lesiones neumónicas y se esteriliza la parte afectada empleando una espátula calentada al rojo vivo, se retira la parte esterilizada con pinzas y tijeras previamente flameadas.
- 2) Se corta un trozo de pulmón de aproximadamente 1 g de peso y se coloca en un homogeneizador (Ten Broeck) estéril con medio de cultivo líquido estéril (3 ml), y se homogeniza hasta formar una suspensión.
- 3) La suspensión se decanta en un tubo estéril y se centrifuga a 2000 rpm durante 10 minutos.
- 4) Se toman 0.3 ml del sobrenadante y se efectúan diluciones logarítmicas hasta  $10^{-5}$  en los medios de cultivo líquido, en tubos que contienen 2.7 ml, se incuban a 37° C durante una semana y se revisan diariamente para observar cambio de coloración (amarillo), los tubos contaminados se desechan.
- 5) De los tubos inoculados no contaminados se toma un inóculo con el asa de platino y se siembra en medio sólido, estos subcultivos de las muestras se revisan cada 5 días. Los medios sólidos inoculados se incuban a 37 C con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante una semana mediante el uso del método de la campana de velobiosis en caso de no contar con estufa de incubación con CO<sub>2</sub>.
- 6) Los medios sólidos se revisan diariamente y las muestras contaminadas se desechan. En las muestras en que se sospecha que haya crecimiento de micoplasmas, se separan de las demás para efectuar una serie de subcultivos con la finalidad de mantener estas cepas viables, las muestras de medio líquido con crecimiento líquido se congeladas a -70° C empleando un crioprotector el cual se emplea de la siguiente manera se toma cultivo de 48 a 72 de incubación (fase logarítmica) en cantidades de 1 ml y se adiciona dimetil sulfóxido (DMSO) en el medio de cultivo a una concentración final

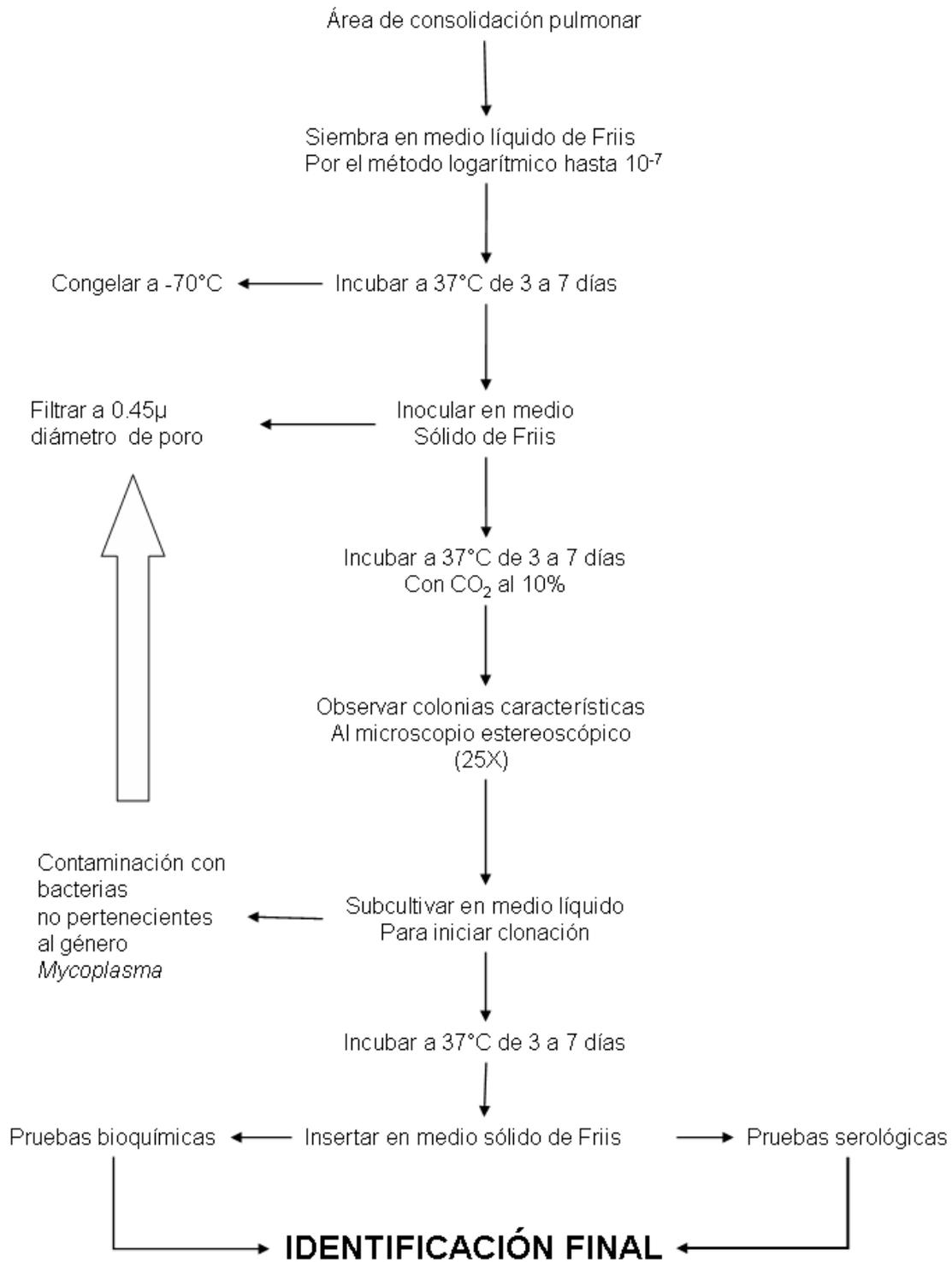
de 1.5 M o glicerol en una relación 1:1, esto reduce la muerte de las células durante el congelamiento a un mínimo (M. Reccach and S. Razin, 1976).

- 7) Para la identificación serológica se requiere de cultivos de micoplasmas puros (ver figura 11), para lo cual es necesario tener cultivos que solo contengan al microorganismo a probar, para ello es necesario hacer una serie de clonaciones. Estas clonaciones se realizan tomando una colonia del medio sólido con una espátula u hoja de bisturí fina y pasarla a un medio líquido, este proceso de las clonaciones se repetirá tantas veces como sea necesario para obtener las colonias puras (ver figura 12).



**Fig. 11.A) Colonias de gotas de rocío de *Mycoplasma hyopneumoniae* en medio de Friis (10X).B) Colonias de *Mycoplasma hyopneumoniae* aisladas de pulmones en medio de Friis (40X)**

Fig. 12 DIAGRAMA PARA EL CULTIVO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Mycoplasma hyopneumoniae*<sup>(37)</sup>



## **4. CAPITULO IV**

### **PRUEBAS DE DIAGNOSTICO**

#### **PRUEBAS BIOQUÍMICAS**

Se realizan estas pruebas para identificar a la bacteria de acuerdo a las características particulares de su metabolismo (cuadro 1 y 2)

#### **4.1 PRUEBA DE DEPENDENCIA DE ESTEROLES (Digitonina).**

Fundamento: esta prueba es un criterio que nos sirve para determinar la familia a la que pertenecen los microorganismos, es decir, si es dependiente de esteroides pertenecerá a la familia *Mycoplasmataceae* y será de la familia *Acholeplasmataceae* si no es dependiente de esteroides<sup>(16, 41)</sup>.

Soluciones para la prueba de dependencia de esteroides:

Soluciones de polianeto sulfonato de sodio (Liquoid Roche) al 5% y de digitonina al 1.5% son esterilizadas por filtración.

Se coloca una gota de Liquoid ó Digitonina sobre discos de papel filtro previamente esterilizado, y se secan a 37°C, almacenándose a 4°C hasta su uso.

Técnica:

Los micoplasmas se siembran en medio de Friis sólido.

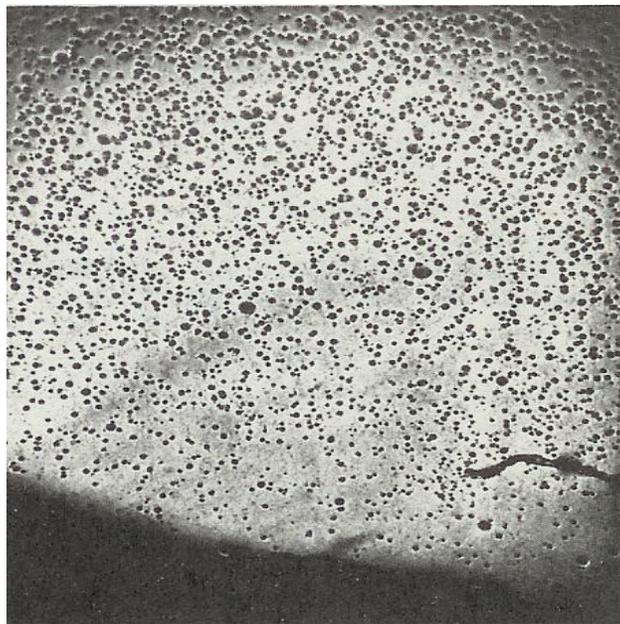
Inmediatamente después se colocan sobre la superficie los sensidiscos impregnados con Liquoid ó digitonina y se incuban a 37° durante 3 a 4 días en condiciones microaerófilas.

Resultados:

Una zona de inhibición de 5 mm alrededor del sensidisco indica dependencia (ver figura 13 y 14)<sup>(16, 41)</sup>.



**Fig. 13. Zona de inhibición de crecimiento entre el sensidisco (color oscuro) y las colonias de micoplasma por la acción de digitonina(25X)**



**Fig. 14. Inhibición de crecimiento negativa entre el sensidisco (color oscuro) y las colonias de micoplasma por la acción de digitonina(25X)**

## **4.2 PRUEBA DE FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS.**

Fundamento: determinar la capacidad de un organismo de fermentar (degradar) un hidrato de carbono específico en un medio de cultivo líquido incorporado a un medio básico, produciendo ácido o ácido con gas visible <sup>(35)</sup>.

Los productos finales de fermentación de los hidratos de carbono (glucosa, fructosa y manosa como los más usados) y los alcoholes denominados colectivamente "azúcares" (inositol y dulcitol como los más usados) son pocos: dos gases, hidrógeno y anhídrido carbónico; algunos pocos ácidos, algunos alcoholes y una cetona. Aunque los productos finales varían en cada especie bacteriana y dependen del sistema enzimático existente en las mismas, así como las condiciones del medio ambiente <sup>(35)</sup>.

**MEDIO DE GLUCOSA.** (Fermentación). Este medio se prepara tomando como base el medio de Friis:

Adicionar glucosa en una mezcla de 1.0 g por 1000 ml. de medio líquido.

Ajustar pH a 7.0 y esterilizar en autoclave junto con la solución de Rojo de Fenol (1%), DNA y los medios basales.

Agregar en forma aséptica los siguientes compuestos previamente esterilizados:

Suero de caballo	200.0 ml.
Extracto de Levadura	100.0 ml.
Penicilina G	500 000 UI.

Se distribuye en tubos de 13 x 100 con tapón de baquelita a razón de 4.5 ml. por tubo y se almacenan a 4°C hasta su uso.

Técnica:

Los micoplasmas son sembrados en el medio.

Se incuban a 37°C durante 3 a 4 días además de los medios líquidos sin sembrar, que serán usados como controles de la prueba.

Resultados: una acidificación (color amarillo) indica una reacción positiva <sup>(41)</sup>.

### **4.3 PRUEBA DE LA HIDRÓLISIS DE ARGININA.**

FUNDAMENTO: medir la capacidad enzimática de un organismo para decarboxilar un aminoácido (L-arginina) y formar una amina con la consiguiente alcalinidad <sup>(35)</sup>. La decarboxilación es el proceso por el cual las bacterias que poseen enzimas decarboxilasas específicas son capaces de atacar a los aminoácidos en su grupo carboxilo (-COOH), dando una amina o una diamina y anhídrido carbónico <sup>(35)</sup>.

MEDIO DE ARGININA. (Hidrólisis).

PPLO Caldo (Difco)	10.0 gr.
L-arginina HCL	5.0 gr.
Rojo de Fenol (Sol 0.2%)	6.25 ml.
Agua Destilada hasta	250.0 ml.

Ajustar pH a 7.0 con NaOH 1N.

Esterilizar por filtración.

Agregar en forma aséptica los siguientes compuestos previamente esterilizados:

Suero de caballo	100.0 ml.
Extracto de Levadura	50.0 ml.
Penicilina G	250 000 UI.

Se distribuye en tubos de 13 x 100 con tapón de baquelita a razón de 4.5 ml. por tubo y se almacenan a 4°C hasta su uso.

Técnica:

Los micoplasmas son sembrados en los medios de arginina líquidos.

Los medios son incubados a 37° durante 3 a 4 días, junto con los medios de arginina sin sembrar que se usaran como controles de la prueba.

Resultados:

Una reacción alcalina (color púrpura) nos indica hidrólisis positiva <sup>(41)</sup>.

#### **4.4 PRUEBA DE PRODUCCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDROGENO.**

Fundamento: esta prueba nos sirve para determinar si el agente es capaz de producir peróxido de hidrógeno "in vitro" en medios de cultivo sólido<sup>(16, 41)</sup>.

Se siembran los micoplasmas en medio de Friis sólido y se incuban a 37° en condiciones microaerofílicas (CO<sub>2</sub> del 5-10%) durante 3 a 4 días<sup>(41)</sup>.

Solución para la prueba de peróxido de hidrógeno:

Preparar solución al 1% de azul de metileno en agua destilada.

Esterilizar en autoclave y almacenar a 4°C.

Técnica:

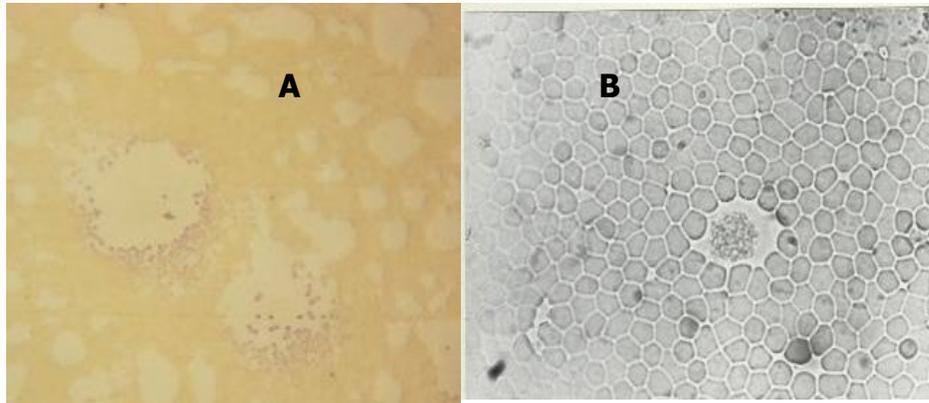
Se cortan pequeños trozos de agar de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> con colonias de micoplasmas y se colocan sobre los portaobjetos.

Por otro lado se utilizan eritrocitos humanos (tipo O) lavados tres veces con solución amortiguadora de fosfatos, después de lo cual se ajustan al 0.5%. Estos eritrocitos se mezclan con un volumen igual de azul de metileno diluido 1: 10 con solución amortiguadora de fosfatos.

De esta mezcla se agregan dos gotas sobre el agar con colonias y al cabo de varios minutos se observan al microscopio.

Resultados:

Una reacción positiva se manifiesta al teñirse los eritrocitos que rodearon las colonias de micoplasmas (ver figura 15)<sup>(41)</sup>.



**Fig. 15.A)** Producción de peróxido de hidrógeno por una cepa de *Mycoplasma hyorhinis*, pueden apreciarse glóbulos rojos alrededor de la colonia teñidos de azul. **B)** Producción de peróxido negativa por la colonia de *M. Hyopneumoniae*.

#### **4.5 FORMACIÓN DE “PELÍCULA” Y “MANCHAS”.**

La formación de “película” y “manchas”, se observa en la superficie del medio sólido donde crecieron los micoplasmas, utilizando un medio con 20% de suero <sup>(16)</sup>.

#### **4.6 PRUEBA DE REDUCCIÓN DEL TETRAZOLIO.**

Fundamento: la 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) <sup>(16 y 41)</sup>.

Técnica:

Sembrar el micoplasma a probar en medios sólidos de Friis conteniendo el colorante tetrazolio a una concentración de 0.03%.

Incubar el medio a 37°C en condiciones microaerofílicas (CO<sub>2</sub> del 5-10%) durante una semana.

Resultados:

Un cambio de color rosado nos indicara positivo, mientras que al no existir un cambio de color, este será negativo <sup>(41)</sup>.

**4.7 PRUEBA DE HIDRÓLISIS DE LA UREA.**

Fundamento: determinar la capacidad de un organismo para desdoblar urea, formando dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa <sup>(35)</sup>.

El sustrato urea es una diamina del ácido carbónico, a la que frecuentemente se menciona como carbamina. Todas las amidas (RCO-NH<sub>2</sub>) son rápidamente hidrolizadas. La hidrólisis de la urea es catalizada por una enzima específica, la ureasa, para dar dos moléculas de amoníaco. En solución la urea se hidroliza dando carbonato de amonio como producto final. La ureasa es una importante enzima microbiana vinculada con la descomposición de los compuestos orgánicos <sup>(35)</sup>.

Técnica

Se siembran los micoplasmas en medios líquidos con urea.

Se incuban a 37°C por 5 días en condiciones microaerófilas.

Resultados: Un color púrpura nos indicara una reacción positiva <sup>(41)</sup>.

**CUADRO 1 PRUEBAS PRIMARIAS DEL GENERO *Mycoplasma***

	<i>Mycoplasma</i>
Gram	-
Forma	Pleomórfico
Motilidad	-
Catalasa	-
Oxidasa	-
Crecimiento en condiciones microaerófilas (5-10% CO <sub>2</sub> )	+

**CUADRO 2 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS  
MICOPLASMAS PORCINOS**

<i>Mycoplasma</i>	Digitonina	Arginina	Urea	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Tetrazolio	Glucosa
<i>hyorhinis</i>	+	-	-	+	-	+
<i>flocculare</i>	+	-	-	-	-	+
<i>hyopneumoniae</i>	+	-	-	-	-	+

<i>Mycoplasma</i>	Fructosa	Manosa	Inositol	Dulcitol	Film-Spot		
<i>hyorhinis</i>	+		+	+	ND		
<i>flocculare</i>	+	+	+	+	-		
<i>hyopneumoniae</i>	+	+	+	+	-		

PIM: Prueba de Inhibición metabólica

PIC: Prueba de Inhibición del crecimiento

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrógeno

Film-Spot: Película y manchas.

ND: Sin datos.

### **PRUEBAS SEROLOGICAS EN LA IDENTIFICACIÓN DE MICOPLASMAS.**

Los anticuerpos pueden ser detectados en muchas formas, pero en algunos casos si bien los anticuerpos dirigidos contra un agente pueden ser determinados por diversos métodos, cada uno de ellos no mide el mismo anticuerpo. Por esta razón los anticuerpos contra un patógeno particular detectados por un método no se correlacionan con la presencia de anticuerpos contra ese mismo agente medidos por otro método<sup>(23)</sup>.

#### **4.8 PRODUCCIÓN Y TITULACIÓN DE SUEROS HIPERINMUNES CONTRA *Mycoplasma hyopneumoniae*.**

Para la producción de suero hiperinmune contra *Mycoplasma hyopneumoniae* se emplean Conejos Nueva Zelanda de aproximadamente 1.5 Kg.,

A los conejos se inocula con *Mycoplasma hyopneumoniae*, a una concentración de  $10^6$  UCC/ml, inactivado con adyuvante oleoso. Se recomiendan a continuación dos calendarios en la inmunización de los conejos. Se recomiendan para la producción de antisueros los dos siguientes calendarios.

El calendario propuesto por Williams y Taylor-Robinson, (1967) consiste en 1 ml de antígeno en aplicar en forma intradérmica en diferentes sitios, 3 semanas después 1 ml de antígeno intramuscular en diferentes sitios. Tres semanas después se toma una se aplica 1 ml de antígeno intramuscular y a la semana siguiente se sacrifica. El calendario propuesto por Pijoan (1973) consiste en aplicar una vez durante cuatro semanas cantidades ascendentes de 1 a 5 ml de antígeno, después de la cuarta semana se dejan descansar los conejos 2 semanas, posteriormente se les aplica 5 ml de antígeno en forma intramuscular. Después de 3 ó 4 días se sacrifica al conejo.

Al concluir los calendarios de inmunización los animales se anestesian y se obtiene su sangre por punción cardíaca, la sangre así obtenida es depositada en tubos estériles y se dejan los tubos 24 horas a 4 C, seguidamente el suero se centrifuga y deposita en alícuotas para su almacenamiento a -20 C hasta su uso.

#### **Titulación de los sueros producidos.**

Para la titulación se emplea la prueba de ELISA Tween 20, realizando diluciones dobles de los sueros, donde se emplea conjugado anti IgG de conejo peroxidado hecho en cabra el cual es titulado previamente para su uso como a continuación se describe.

## **Titulación del conjugado anti IgG de Conejo Peroxidado.**

### **Material**

Anti IgG de conejo peroxidado hecho en cabra (Sigma Immunochemicals: Product Número: A -0545 Lot Number 074H4289.USA)

Kit Comercial Microwell ELISA mate for Peroxidase Congujate (KPL cat. no. 54-62-00. UK).

Se colocan 200  $\mu$ ls  $\mu$ en la columna número uno del suero de conejo.

Se transfieren 100  $\mu$ ls de la columna 1 a la 2. Mezclar cuidadosamente pipeteando de 3 a 5 veces.

Se repetir el paso 3 hasta llegar al final de la placa. Descartar los 100  $\mu$ ls finales después de mezclar la columna 11. La columna 12 sirve como control.

Se deja incubando toda la noche a 4 C.

Se realizan diluciones del conjugado de la línea A a la G La línea H sirve de control.

Se incuba 1 hr a temperatura ambiente.

Se realiza lavado con solución de lavado.

Se aplican 100  $\mu$ ls de la solución de revelado o sustrato (ABTS).

Se aplica una solución de paro o Stop a los 25 minutos.

Se realiza la lectura de la placa a 405 nm.

De acuerdo a los resultados obtenidos de las lecturas se considera que la dilución optima a usarse de anti IgG de conejo peroxidado.

### **Titulación de los sueros de los conejos.**

#### **Aplicación del Antígeno.**

Se sensibilizan placas con 100  $\mu$ ls del antígeno Tween 20 de *Mycoplasma hyopneumoniae* a una dilución 1:30000 toda la noche a 4 C en solución sensibilizadora

Se retira el antígeno excedente.

Se bloquea la placa con solución bloqueadora aplicando 300  $\mu$ ls a cada pozo y

Se deja incubar 30 minutos a temperatura ambiente.

Se retira la solución bloqueadora

Reacción del suero de conejo (anticuerpo primario)

Se realizan diluciones dobles del suero de conejo ocupando 16 pozos por muestra, haciéndose por duplicado.

Se incuba una hora a temperatura ambiente.

Se lava con solución de lavado durante 5 minutos.

Aplicación del anticuerpo secundario

Se aplica el anticuerpo secundario (anti IgG de conejo peroxidado) a la dilución establecida y se aplican 100  $\mu$ ls a cada pozo de cada dilución del suero.

Se incuba 1 h a temperatura ambiente.

Se lava con solución de lavado durante 5 minutos.

Aplicación del Sustrato.

Se aplican 100  $\mu$ ls de la Solución sustrato ABTS a cada pozo.

Se incuban 25 minutos a temperatura ambiente.

Se aplican 100  $\mu$ ls a cada pozo de la solución de paro.

El último pozo que presente color se considera el título del suero.

#### **4.9 PRUEBAS DE NEUTRALIZACION**

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 y la prueba de inhibición del crecimiento. Estas dos pruebas son muy similares ya que son pruebas de neutralización, la cuál se lleva a cabo por medio de un antisuero homólogo, el cuál ejerce una actividad inhibitoria. La diferencia básica es que la prueba de inhibición metabólica se realiza en medio líquido y la prueba de inhibición del crecimiento se realiza en medio sólido<sup>(4, 23, 34)</sup>.

#### **4.10 PRUEBA DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO** (Growth- Inhibition Test GIT).

Esta se realiza utilizando el método descrito por Clyde (1964).

Discos de papel de filtro de 5 mm de diámetro se esterilizan en autoclave. Con una gota del antisuero específico de *Mycoplasma hyopneumoniae* elaborado en conejo, cada disco se impregna, y se colocan los discos en una caja de petri estéril y se dejan secar a 37 C toda la noche. Después se almacenan en un frasco estéril a -70 °C hasta el momento de su uso.

Esta prueba se lleva a cabo de la siguiente manera: cajas conteniendo medio sólido de Friis se inoculan con los cultivos de micoplasmas empleando para ello hisópo y sembrando sobre la placa en tres direcciones tratando de obtener un crecimiento uniforme. Después el inóculo se deja secar junto al mechero o incubando la caja a 37 C durante aproximadamente 15 minutos. Ya seca la caja se colocan los discos sobre la superficie del agar y la caja es incubada por aproximadamente una semana. Una zona de inhibición de crecimiento de 0.3 a 5 mm diámetro alrededor del disco se considera una reacción positiva (ver figura16).

#### **4.11 PRUEBA DE INHIBICION METABOLICA**

Como el nombre implica, esta prueba es esencialmente una prueba en la cual un antisuero da un lento crecimiento de un micoplasma desconocido por un periodo de tiempo o lo evita completamente. El lento crecimiento es detectado por la observación de un cambio de color. Se da el cambio en el sustrato dependiendo del metabolismo del micoplasma y el indicador usado. La prueba de inhibición metabólica es menos confiable para la identificación de micoplasmas que la serológica. Primero, la precisión de la prueba es altamente dependiente de la cepa desconocida de un cultivo puro. Entonces, también, las precauciones deben ser hechas para estar seguros que el organismo tiene un suficiente crecimiento en el caldo para que los cambios del indicador lo alcancen a un razonable tiempo. Es una prueba simple en concepción, pero a menudo su práctica no es bien trabajada, a no ser que el diagnóstico de laboratorio use la prueba de inhibición metabólica rutinariamente<sup>(4)</sup>.

Procedimiento:

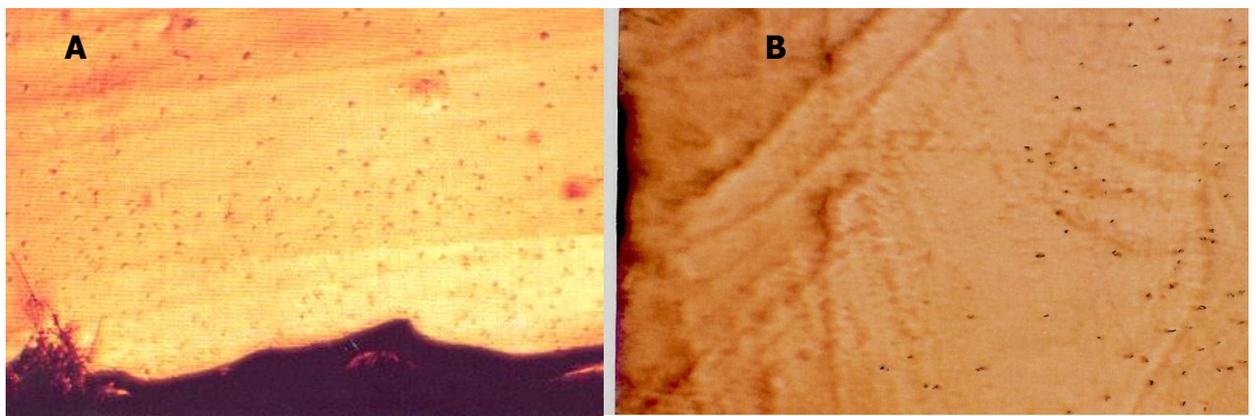
Se realiza dilución doble con PBS estéril en 5 tubos de ensaye hasta 1:32 de antisuero contra *Mycoplasma hyopneumoniae*

De un cultivo de *Mycoplasma* sp. De aproximadamente 72 horas de crecimiento en un medio líquido se toma 0.3ml y se depositan en cada tubo donde se realizaron las diluciones.

Incubar los tubos a 37°C durante 7 días.

Interpretación:

La falta de crecimiento en cualquiera de los tubos se considera una reacción positiva, el crecimiento en todos los tubos refiere una reacción negativa.



**Fig. 16 Prueba de inhibición de crecimiento entre el sensibilizado con antisuero contra *M. hyopneumoniae* y las colonias del micoplasma. A) Reacción negativa B) Reacción positiva**

## **PRUEBAS DE DIAGNOSTICO EN TEJIDO PULMONAR**

### **4.12 INMUNOFLUORESCENCIA**

Los colorantes fluorescentes por ejemplo, fluoresceína y auramina, pueden unirse por covalencia a moléculas de anticuerpos, y hacerse visibles con la luz ultravioleta (UV) en el microscopio de fluorescencia. Este anticuerpo "marcado" o "etiquetado" puede usarse para identificar antígenos, por ejemplo la superficie de bacterias, en células de cortes histológicos o en otras muestras. La reacción de inmunofluorescencia se llama directa cuando el anticuerpo etiquetado conocido

interactúa sin intermediarios con el antígeno desconocido e indirecta cuando se emplea un proceso de dos etapas (por ejemplo, un antígeno conocido se adhiere a un portaobjetos, se agrega suero desconocido y se lava la preparación; si el anticuerpo sérico desconocido ajusta con el antígeno, quedará adherido a éste en el portaobjetos y puede detectarse por adición de anticuerpo antiglobulina marcado con colorante fluorescente y examinarse en el microscopio UV). A menudo, la prueba indirecta es más sensible que la directa en la técnica de inmunofluorescencia, debido a que más anticuerpo marcado se adhiere por cada sitio antigénico, Además, la antiglobulina marcada se convierte en un "reactivo universal"; es decir, independiente de la naturaleza del antígeno usado, la antiglobulina reacciona con todas la IgG de esa especie <sup>(4, 23, 34)</sup>.

#### **4.13 TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA**

##### **Uso del Crioprotector**

Para mantener la integridad bronquiolar y evitar que el epitelio mucociliar se desprendiera durante el manejo de las muestras, se recomienda el empleo de un crioprotector que puede ser Tissue Tek o JIm Se toma una porción del pulmón procurando contener bronquio y se procura congelar  $-70$ .

Se realizan cortes de 8 micras de grueso en el crióstato a  $-20\text{C}^{\circ}$ , y se colocan en portaobjetos de vidrio desengrasados, después se secan al aire durante unos segundos y se fijan en acetona fría ( $-20\text{C}^{\circ}$ ) durante 10 minutos

Procedimiento:

A los cortes se les aplica una gota del conjugado de fluorescencia, que quede cubierto todo el tejido.

Se incuban por 30 min. En una cámara húmeda a  $37^{\circ}\text{C}$ .

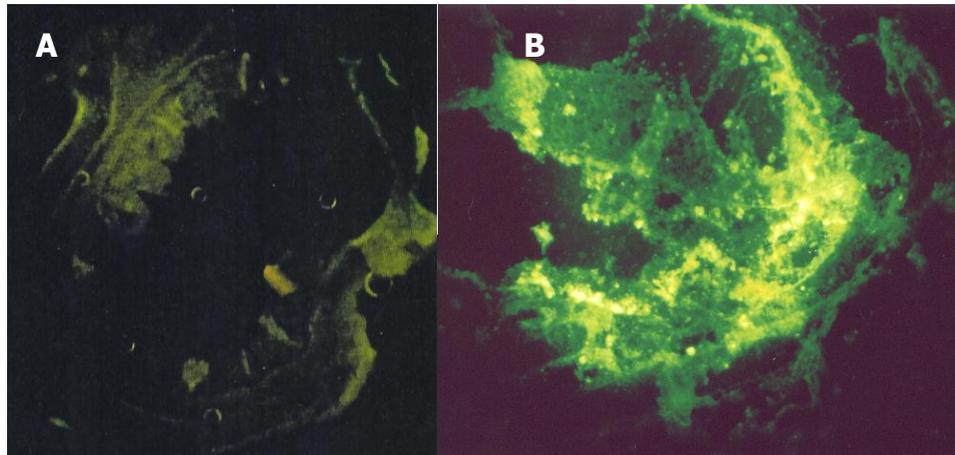
Se lavan con solución de fosfatos o solución bufer fosfato (PBS) isotónica, pH 7.2-7.4, 1 M, tres veces de 5 minutos, cada una. Se dejan secar a temperatura ambiente.

Se le aplica una gota de glicerina fosfatada sobre la preparación y se le coloca

encima un cubreobjetos.

Se observan en un microscopio de fluorescencia.

En una reacción positiva pueden apreciarse focos fluorescentes de color verde amarillentos adheridos al epitelio muco ciliar (ver figura 17).



**Fig. 17 A)** Ejemplo representativo de un control negativo a la prueba de Inmunofluorescencia de un corte de pulmón fetal (10X). **B)** Observación de focos fluorescentes de un corte de pulmón positivo al aislamiento de *M. hyopneumoniae* (10X).

#### **4.14 PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.**

Controles.

Previa la realización de la prueba se establecer los controles para el conjugado, es decir la antiglobulina contra IgG de conejo, con el fin de eliminar fluorescencia inespecífica como puede apreciarse en el Cuadro 3.

**Cuadro 3. Controles de la Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta.**

Conjugado	Conjugado absorbido		Conjugado absorbido
	Solo	con pulmón de feto	con pulmón normal (6 meses)
Pulmón fetal normal	X	X	X
Pulmón normal (6 meses)	X	X	X
Pulmón con lesiones y Con aislamiento positivo de <i>M. hyopneumoniae</i> .	X	X	X
Pulmón con lesiones Y aislamiento positivo de <i>M. hyopneumoniae</i>	X	X	X

Conjugado: antiglobulina contra IgG de conejo.

X: Se hacen reaccionar y deben de dar resultados negativos.

Después de fijados los cortes pulmonares se les rodea con barniz de uñas o lápiz graso se realiza lo siguiente:

1. Se coloca una gota el antisuero, una del suero normal y otra del conjugado de acuerdo al esquema establecido.
2. Se colocan las laminillas en cámara húmeda y se incuban a 37 C durante 30 minutos.

3. Lavar con PBS durante 10 minutos.
4. Lavar con agua destilada durante 5 minutos.
5. Dejar secar a temperatura ambiente.
6. Colocar a cada círculo antigamaglobulina de conejo marcada con fluoresceína.
7. Colocar las laminillas en cámara húmeda a 37 C durante 30 minutos.
8. Lavar con PBS durante 10 minutos.
9. Lavar con agua destilada durante 5 minutos.
10. Secar a temperatura ambiente.
11. Colocar una gota de glicerina a cada muestra y ponerle un cubreobjetos.
12. Observar en microscopio de inmunofluorescencia.

#### **4.15 PRUEBA DE EPIFLUORESCENCIA.**

Esa prueba se emplea para la identificación de colonias de micoplasmas. Se realiza de la siguiente manera:

Se siembran los micoplasmas en medio sólido de Friis

Incubar durante 3 o 4 días a 37 C.

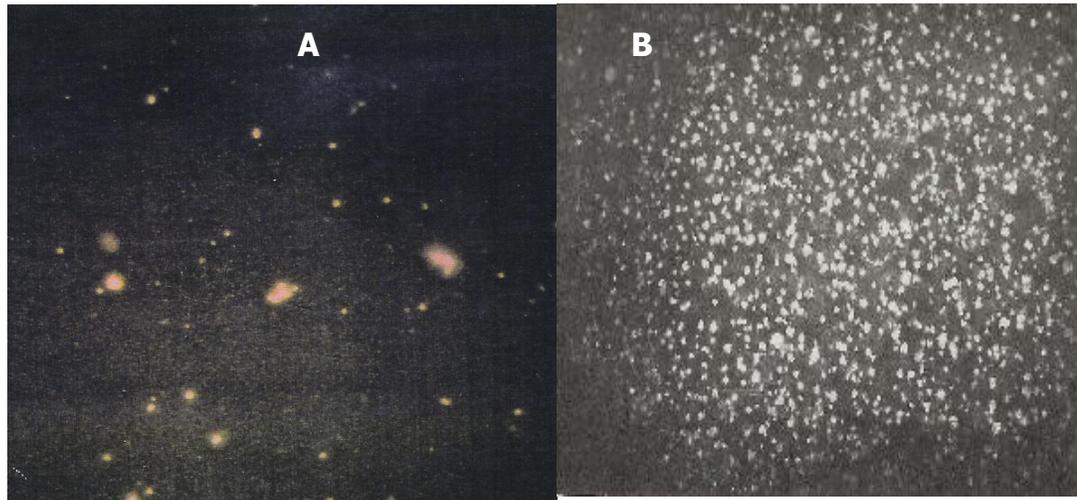
Cortar varios bloques a 1 cm<sup>3</sup> y colocarlos en portaobjetos.

Aplicar el antisuero en las colonias e incubar a 37C durante una hora.

Lavar con PBS y colocar una gota del conjugado e incubar a 37 C durante una hora.

Lavar con PBS.

La observación de las colonias fluorescentes indica una reacción positiva (ver figura 18).



**Fig. 18 A) Observación de focos fluorescentes de improntas de colonias de micoplasmas (40X). B) Colonias de micoplasmas fluorescentes mediante la técnica de Inmunofluorescencia indirecta sobre medio de Friis (25X).**

#### **4.16 INMUNOPEROXIDASA DIRECTA**

Se obtiene un antisuero contra *Mycoplasma hyopneumoniae*, obtenido de un conejo, mediante un riguroso protocolo de inmunización con un inmunógeno específico.

A partir del antisuero se obtiene una fracción purificada de inmunoglobulina G de acuerdo a la técnica descrita por Sánchez Vizcaíno (1990). El acoplamiento de la peroxidasa de rábano (Tipo IV sigma), se realiza por medio de peryodato de sodio de acuerdo al método descrito por Avrameas y Ternyinc (1989).

Titulación del conjugado.

Para la titulación del conjugado se sigue la metodología modificada propuesta por Bruggman y cols. (1977), se emplean frotis de *Mycoplasma hyopneumoniae*, las cuales primeramente se fijan en metanol absoluto con 0.1% de peróxido de

hidrógeno por 20 minutos, con la finalidad de destruir la actividad de la peroxidasa endógena.

Los frotis son lavados con agua destilada y después incubados con las diluciones de los conjugados diluidos con 0.5 ml Tris-HCl, 0.15 M cloruro de sodio, 1 ml de ácido edético (EDTA) con pH de 7.5 (TBSE), por 60 minutos en cámara húmeda.

Después los frotis son lavados por 15 minutos con tres cambios de TBSE.

Posteriormente se incuban con el sustrato por 10 minutos. El sustrato se prepara de acuerdo a Ternyinc y Avrameas (1989) de la siguiente manera se disuelven 5 mg. de tetracloruro de diaminobencidina (DAB, Sigma) en 10 ml. de una solución reguladora Tris-HCl 0.1 M pH 7.6, añadiendo 0.1 ml. de peróxido de hidrogeno al 3%.

Se enjuagan los frotis con agua destilada, se secan y se montan en glicerol.

Posteriormente se examinan en un microscopio óptico.

Los controles negativos usados son un pulmón normal de un cerdo de 6 meses de edad así como de un pulmón fetal de cerdo.

### Resultado

Los organismos de *Mycoplasma hyopneumoniae* de los frotis son vistos como pequeñas estructuras café rojizas. Para el caso de los pulmones neumónicos estas estructuras son observadas al borde del epitelio bronquiolar. Para el caso de los controles negativos la observación de las estructuras mencionadas serán negativas (ver figura19)<sup>(15)</sup>.

### 4.17 PRUEBA DE INMUNOPEROXIDASA INDIRECTA (IPI)

#### Materiales

#### Anticuerpos:

Anticuerpo primario: Se utiliza un antisuero contra *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Anticuerpo secundario: Se utiliza el conjugado anti IgG de conejo peroxidado - Sigma Immunochemicals

#### Procedimiento:

Preparación de las muestras (controles y muestras problema) para corte en el

criostato:

Las muestras pulmonares se conservan a  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $-25^{\circ}\text{C}$ , se fijan en acetona a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 10 min. y se congelan a la misma temperatura hasta el momento de la tinción.

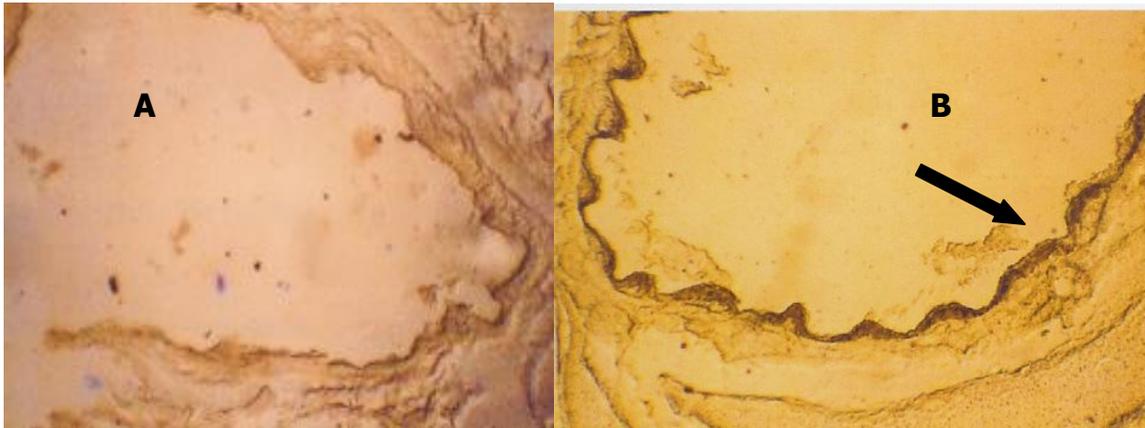
Estandarización de la dilución óptima de los anticuerpos a usar en la prueba:

Los títulos óptimos de los anticuerpos primarios (suero) y secundario (conjugado) se obtienen mediante la técnica de tablero de ajedrez realizado sobre los cortes de los controles positivos.

Técnica de inmunoperoxidasa indirecta.

1. Se colocan los cortes en metanol absoluto con 0.1% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3% por 60 min.
2. Se lavan las laminillas con solución de fosfatos o PBS isotónica ( $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-}12\text{H}_2\text{O}/\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) con un pH 7.2, 1 M (2 lavados de 3 a 5 min. cada uno).
3. Se retira la mayor cantidad de líquido sobrante y se coloca una gota de anticuerpo (Ac) primario, diluido previamente a 1:1000 en una solución de Caseinato de Calcio al 0.5% o BSA al 3%, en PBS pH 4, 0.1 M, en cada uno de los cortes cubriéndolos completamente con dicha solución.
4. Se les incuba a temperatura ambiente durante 90 min., en cámara húmeda.
5. Transcurrido el tiempo de incubación se hace una segunda serie de lavados a las mismas condiciones que en el paso 2.
6. Se retira el sobrenadante de líquido y se agrega al Ac secundario, diluido con anterioridad 1:1000 en una solución de Caseinato de Calcio al 0.5% o BSA al 3%, en PBS pH 4, 0.1 M., procediendo de manera semejante al primario.
7. Se incuba a iguales condiciones.
8. Se lava a iguales condiciones que en el paso 2.
9. Se pone la solución de revelado de 3-4 Mg DAB (3,3-diamino benzidina) en 5 ml de Tris-HCl = 0.05 M, pH 7.6 y 10 MI de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3% e incubo de 20-25 minutos transcurridos los cuales se enjuagan las laminillas con agua destilada.
10. Se observan las laminillas en el microscopio óptico<sup>(35)</sup>.

Los resultados son los mismos que se explicaron en la técnica directa.



**Fig.19 A)** Ejemplo representativo de un control negativo a la prueba de inmunoperoxidasa, proveniente de un pulmón fetal porcino (10X).**B)** Prueba de inmunoperoxidasa positiva donde se muestran estructuras café rojizas de *M. hyopneumoniae* adheridos al epitelio (flecha) 10 X.

## **INMUNODIAGNOSTICO**

### **4.18 ANALISIS INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMA (ELISA)**

La técnica ELISA fue descrita casi al mismo tiempo, en 1971 por dos equipos de trabajo diferente, el de Ebgvall y Perlmann en Suecia y el de Van Weemen y Schuurs en Holanda. Es una de las técnicas de mayor aplicación en el área de patología animal, obteniéndose en todos los casos resultados muy favorables <sup>(20, 30)</sup>.

Esta técnica es un inmunoensayo que permite determinar la concentración de un antígeno o un anticuerpo mediante el uso de uno de ellos en fase sólida y el otro en solución, detectándose la formación de un complejo antígeno-anticuerpo mediante un trazador enzimático<sup>(11, 30)</sup>; es una prueba muy sensible (93-95.6%) y específica (97-98.8%) <sup>(48, 49)</sup>.

Existe una infinidad de modalidades y clasificaciones de la técnica ELISA <sup>(11)</sup>.

**Método de emparedado o sándwich**

Consiste en inmovilizar un exceso de anticuerpo en una fase sólida el cual es incubado con un control o muestra en la que se presume existe el antígeno; después de lavar el complejo antígeno-anticuerpo inmovilizado, se incuba con un exceso de anticuerpo conjugado con la enzima, que se une a los sitios antigénicos remanentes. Este segundo anticuerpo se puede usar sin marca y en este caso se usaría un tercer anticuerpo específico para el anterior complejo marcado <sup>(11)</sup>.

**Método indirecto**

El antígeno es fijado o inmovilizado en un soporte de fase sólida, se incuba con el suero que contiene el anticuerpo, se lava y se añade el conjugado, que consiste en una antiinmunoglobulina conjugada con la enzima, de tal manera que reaccione contra el anticuerpo del complejo primario; se lava y se adiciona el sustrato <sup>(11)</sup>.

**Método directo**

El anticuerpo es inmovilizado en un soporte de fase sólida. Se adiciona una solución que contenga antígeno y antígeno conjugado con la enzima, se incuban y se lavan; la cantidad de antígeno conjugado con la enzima que reacciono con el anticuerpo es medida por la hidrólisis del sustrato <sup>(11)</sup>.

Los soportes en los cuales se puede fijar el antígeno o el anticuerpo pueden ser partículas de nitrocelulosa, poliacrilamida, silicón, goma y plástico (polivinil, poliestireno, etc.) <sup>(11)</sup>.

**DETERMINACION DE *Mycoplasma hyopneumoniae* POR EL METODO DE ELISA (CHEKIT-HYOPTTEST), PRUEBA COMERCIAL.**

La prueba comercial llamada Chekit hyoptest, fue elaborada por el Dr. Brommeli AG Suiza, es una prueba rápida, simple y específica para la detección de anticuerpos contra *Mycoplasma hyopneumoniae* en suero, plasma o calostro, se fundamenta en el método de ELISA <sup>(11)</sup>.

1. Realizar una predilución a cada suero y controles a una dilución 1:100 en un tubo, usando solución del Kit.
2. Colocar 200  $\mu$ l de los sueros y controles prediluidos en el pozo correspondiente por duplicado.
3. Cubrir la placa con una tapa e incubar por 90 min. en temperatura ambiente en cámara húmeda.
4. Lavado de la placa.
5. Después de la incubación sacudir la placa.
6. Agregar a cada pozo aprox. 300  $\mu$ l (sol. lavado) evitando la formación de burbujas.
7. Repetir este procedimiento 2 veces.
8. Sacudir la placa, vaciando los pozos.
9. Golpear suavemente sobre un papel absorbente.
10. Dilución, distribución e incubación del conjugado.
11. Diluir el Chekit-Peroxidasa (conjugado) 1:200 usando solución de lavado-dilución.
12. Colocar 200  $\mu$ l de esta dilución dentro de cada pozo, cubrir e incubar 60 min. a temperatura de ambiente en una cámara húmeda.
13. Lavar la placa nuevamente

**Adición del Chekit-cromógeno:**

Adicionar 200  $\mu$ l del Chekit-cromógeno precalentado a 25°C a cada pozo.

**Lectura de los resultados:**

Leer los resultados con un fotómetro a una longitud de onda de 405 nm.

La diferencia entre la densidad óptica (D.O.) del control (-) y control (+) es mayor o igual a 0.3 (ocurriendo esto dentro de 15 a 30 min. después de adicionar el cromógeno), la reacción se puede parar Adicionando 50  $\mu$ l de sol-stop a temperatura ambiente.

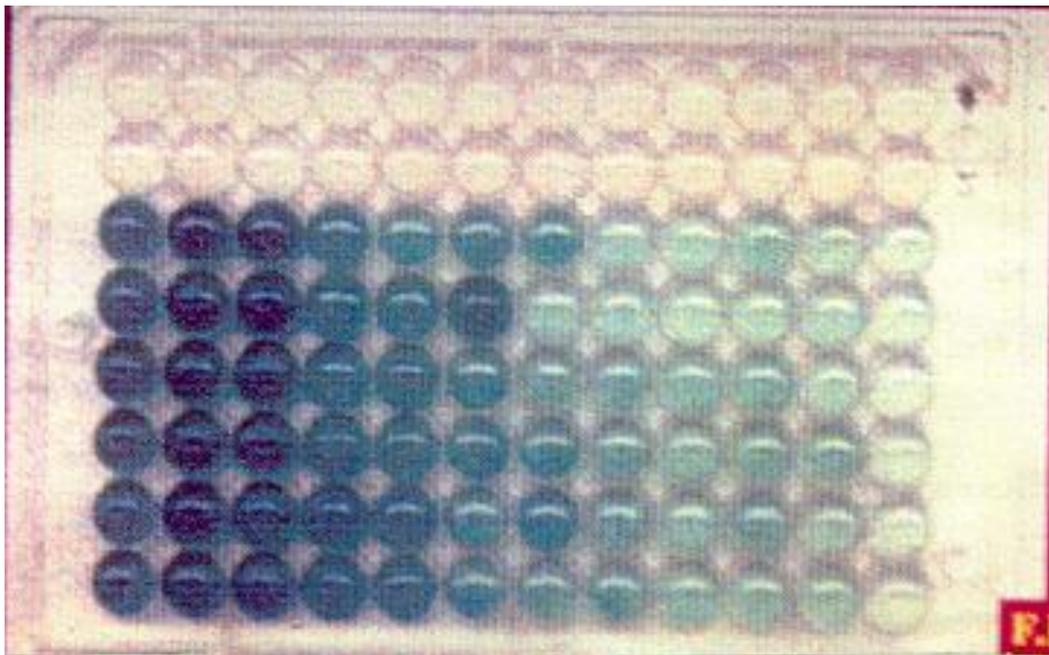
**Interpretación de resultados:**

Sacar la media de la D.O. de cada muestra, control (+) y control (-).

Corregir todo con la D.O. del control (-) (ver Figura 20).

$$\text{Valor (\%)} \doteq \frac{\text{D.O. muestra} - \text{D.O. negativo}}{\text{D.O. positivo} - \text{D.O. negativo}} \times 100$$

Valor	< 50 %	50-70 %	>70 %
Interpretación	negativo	ambiguo	positivo



**Fig. 20** Prueba de ELISA. Se muestra una microplaca con los siguientes resultados: 1er carril antígeno solo. 2º carril: suero control negativo proveniente de un cerdo libre de enfermedades respiratorias. 3er carril: suero control positivo proveniente de un cerdo inoculado con *M. hyopneumoniae*. Los demás carriles corresponden a diversos sueros de cerdos infectados naturalmente (de campo). Se realizaron diluciones dobles de los sueros.

#### **4.19 REACCION DE CADENA DE POLIMERASA (PCR)**

Cada vez se sugieren nuevos caminos para utilizar tecnología para el diagnóstico de enfermedades o identificación de patógenos, aunque todavía no son adaptados para usarse de rutina<sup>(46)</sup>

Uno de estos caminos es la reacción de cadena de polimerasa (PCR). Una vez conocida a la par la composición de un gen específico o parte de un gen. Una pequeñísima cantidad del gen en solución puede ser selectivamente amplificado. Una secuencia del gen complementario con principios de DNA polimerasa son usados como blanco para unir una secuencia en cuestión. Si se presenta, la primera doble fijación creada servirá como plantilla en la cual ocurrirá alrededor de esta otra replicación. La reacción es dramáticamente veloz porque de la habilidad para automatizar la desnaturalización de DNA y la subsecuente elongación de la cadena da base al descubrimiento de una polimerasa térmicamente estable<sup>(46)</sup>.

Se ha realizado un análisis con preparación arbitraria de PCR (AP-PCR) en el cual una amplificación de baja intensidad con una simple cartilla, fue usada para investigar la variabilidad genética en cepas de *Mycoplasma hyopneumoniae* en aislamientos de campo; estos datos mostraron que este microorganismo es sumamente variado y las cepas pueden dividirse al menos en 6 subgrupos epidemiológicos sobre la base de los resultados de AP-PCR<sup>(2)</sup>.

A continuación se muestran dos procedimientos que pueden ser empleados para el diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

##### **Método 1<sup>(36)</sup>.**

##### **Extracción del DNA.**

Tomar la muestra en 500 µl de un buffer

Colocar en un tubo eppendorf grande

Centrifugar por 5 minutos a 14,000 rpm.

Resuspender en 400 µl

Hervir un minuto

Añadir 500 µl de alcohol isoamílico-cloroformo-fenol  
Mezclar y centrifugar 1 minuto  
Tomar la parte superior y colocarla en otro tubo eppendorf  
Añadir 500 µl de cloroformo isoamílico  
Mezclar varias veces y centrifugar 1 minuto  
Tomar la parte superior y colocarla en otro tubo eppendorf  
Añadir 20 µl de acetato de sodio  
Añadir 500µl de ROH 100%  
Poner en hielo 5 minutos  
Centrifugar 10 minutos  
Sacar el ROH y dejar secar  
Resuspender en 100µl de agua destilada  
Guardar en refrigeración.

**Amplificación del material genético.**

Poner 10µl de DNA en tubo eppendorf en hielo  
18 µl de agua destilada  
5 µl de buffer  
5 µl de primer a  
5 µl de primer b  
10 µl de MgCl<sub>2</sub>  
5.6 µl de dNTPS  
3 µl de taq polimerasa  
Añadir 50 µl de mix en cada tubo eppendorf  
Colocar los tubos en el termociclador con las condiciones necesarias para  
*Mycoplasma hyopneumoniae*  
Al término de la reacción correr la muestra en un gel de agarosa al 2%.

Método 2 <sup>(25)</sup>

Preparado de DNA cromosomal.

1. Las células se obtienen a partir de 10 ml de cultivo centrifugados a 20 000 x g durante 15 min. a 4°C, lavados con solución bufer fosfato (0.14 M NaCl, 0.01 M fosfato de sodio; con pH de 7.3) y resuspendido en 100 ml de bufer TE (0.01 M Tris, 0.001 M EDTA; con pH de 8.0).
2. Se añaden 100 ml de sulfato duodecil de sodio y proteinasa K (concentración final, 400 mg/ml; Química Sigma Co., St Louis, Mo.) y la mezcla es incubada por 1 hr. a 37 °C.
3. Se agregan 10 ml de "glass milk" (Biolol Inc.; La Jolla, Calif.) en la suspensión y se incuba por 5 min. a 0°C.
4. El "glass milk"-DNA precipitado se lava en 3 tiempos con Wow Wash Buffer (Biolol, Inc.) sin sacudir, y el DNA eluido con ml de buffer TE a 46°C por 5 min.
5. La concentración de DNA de cada muestra debe ser determinada por fluorescencia para verificar que el DNA esta intacto, se alícuota por electroforesis en un gel burato-Tris con 0.7% de agarosa, y el gel es fijado con bromuro de etilo <sup>(2)</sup>.

Las cartillas de oligonucleotidos son obtenidas y comparadas por medio de un programa de computación de alineación múltiple.

Los oligonucleotidos son sintetizados por medio del método de fosforamidación. La concentración y purificación parcial de las cartillas son determinadas por adsorción a 260 nm.

**Amplificación**

1. La mezcla de la reacción consiste en la 4 desoxirribonucleotido trifosfato, cada una a una concentración final de 100 µM y las especies positivas y negativas con una concentración final de 100 nM.
2. El termociclo consiste de 1 ciclo a 96°C por 5 minutos seguido por 25 ciclos a 95°C por 30 segundos, 61°C por 30 segundos y 72°C por 90 segundos.
3. Amplificado el material se precipita con etanol y se colecta por medio de

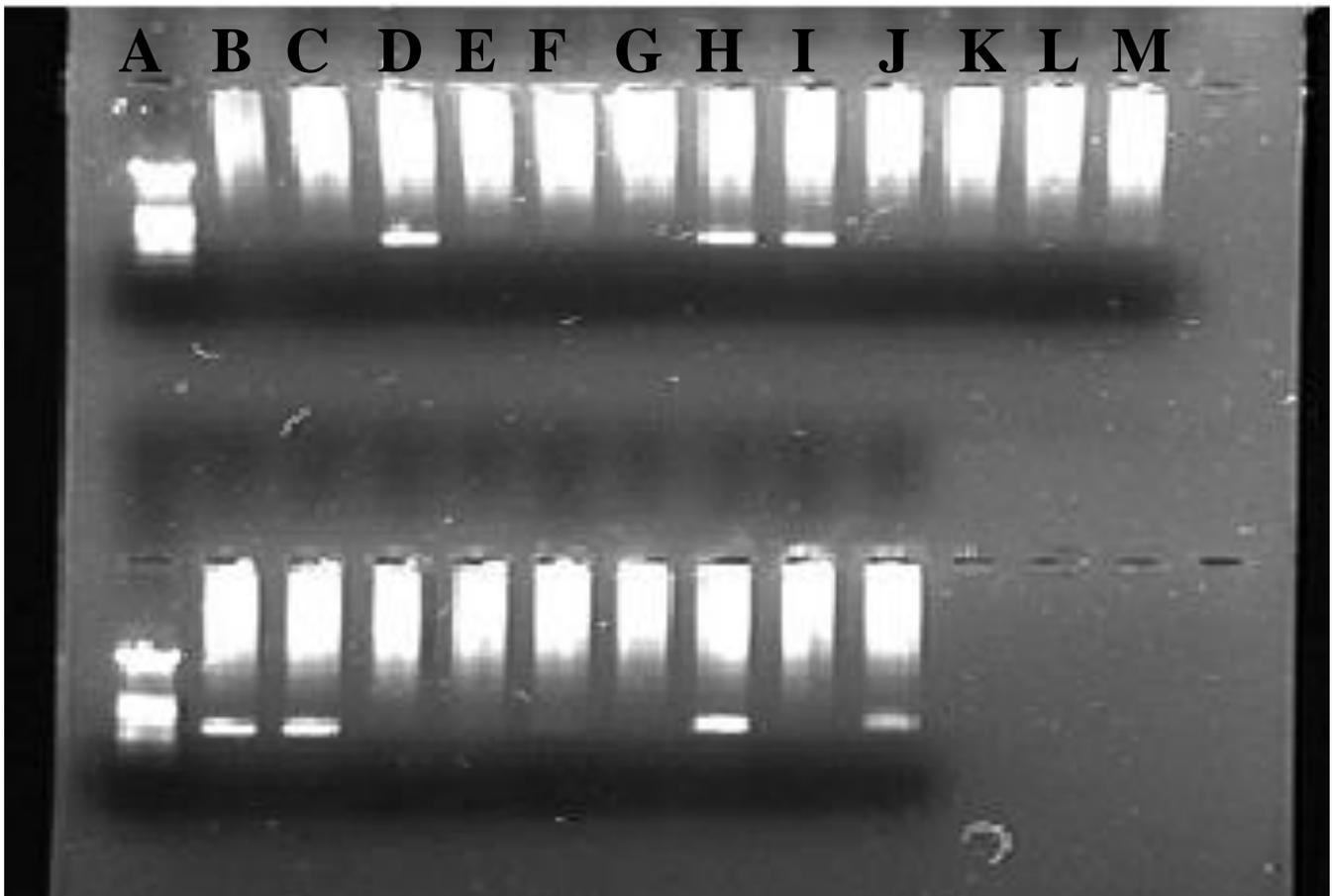
centrifugación a 15,000 r.p.m. durante 10 minutos.

4. Las partículas secas se disuelven en 17  $\mu$ l de una solución de 10 mM Tris, 1 mM EDTA y 2  $\mu$ l de colorante marcador.

5. 5  $\mu$ l de solución final se adiciona en 1.2 o 1.5% de agarosa sumergido en gel.

6. El gel es coloreado con bromuro de etilo y fotografiado

7. Las regiones de múltiple similitud se identifican visualmente (ver figura 21) <sup>(2, 27)</sup>.



**Fig. 21** Gel de electroforesis en agarosa al 1% que muestra las reacciones de PCR para el diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae* A: marcadores de bases de nucleótidos B y C: controles negativos, D: control positivo, a partir de esta columna todas las siguientes que tienen una banda inferior son positivas y proceden de casos clínicos

**REFERENCIAS CITADAS**

1. Appendini Tazzer. Et, all. Manual de Laboratorio de Histología Veterinaria. Toma y Envío de Muestras. UNAM.2000
2. Artiushin S, Minion FC,. Arbitrarily Primed PCR Analysis of *Mycoplasma hyopneumoniae* Field Isolates Demonstrates Genetic Heterogeneity. International Journal of Systematic Bacteriology. 1996; 46: 1, 324-328.
3. Armstrong CH, Freeman MJ, Sands-Freeman L, Lopez-Osuna M, Young T, Runnels LJ. Comparison of the Enzyme-linked Immunosorbent Assay and the Indirect Hemagglutination and Complement Fixation Tests for Detecting Antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. Canadian Journal Comp. Med. 1983; 47: 464-470.
4. Carter GR. Diagnostic Procedures in Veterinary, Bacteriology and Mycology; 5<sup>a</sup> Ed; USA; 1990. 359-369
5. Beer J. Enfermedades Infecciosas de los Animales Domésticos; Tomo I Ed. Acribia; España; 1987. 431-438.
6. Biberstein EL, Chung ZY. Tratado de Microbiología Veterinaria; Blackwell Scientific Publications; USA 1994. 241-248.
7. Blood DC, Radostits OM. Henderson JA, Arundel JH. Gay CC. Medicina Veterinaria;6<sup>a</sup> Ed. Interamericana. México. 1986.
8. Calsamiyilia m. *Mycoplasma hyopneumoniae* epidemiología y control. Unidad de histología. Facultad de veterinaria. Pub. Curso gral. De Col. Vet. España. 11-50. 2001
9. Ciprián CA. Mendoza ES. Neumonía Enzoótica, Diagnóstico, Control y Prevención. Porcira. México. 1993. 39: 38-51.

10. Cowan. Steel's. Manual for the Identification of Medical Bacteria. Cambridge University Press, 1981.
11. Cordova RH. Desarrollo de una Prueba ELISA-DOT Tween 20 H-H para el Diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos. Tesis de licenciatura. FES Cuautitlan UNAM. México. 1998.
12. Cruz ST. Identificación de *Mycoplasma hyopneumoniae* a Partir de Pulmones Neumónicos de Cerdo en México. Tesis de licenciatura. FES Cuautitlán. UNAM. México. 1983.
13. Cruz S.T. Evaluación de 2 Inmunógenos de *Mycoplasma hyopneumoniae* en Cerdos Convencionales. Tesis de Maestría, FES Cuautitlan-UNAM. México 1991.
14. Cruz S.T. Neumonía Enzootica en México. Nuestro Acontecer Porcino. México. 1993. 8:22-32.
15. Cruz ST. Colmenares VG. Fernández BE. Ciprián CA. Diagnóstico de la Neumonía Enzootica (*Mycoplasma hyopneumoniae*) por el Método de Inmunoperoxidasa Directo. Memorias del XXIX congreso nacional AMVEC. Puerto Vallarta, Jalisco. México. 1994.
16. Cruz ST. Mendoza ES. Ciprián, CA. Neumonía Enzootica: Etiología, Inmunidad y Diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Memorias. Primer Ciclo Nacional. Afecciones Respiratorias del Cerdo. Editores: Ciprián. Mendoza. García M. Mérida, Yucatán. México. 1994. 38-58
17. Díaz E. Estrada R. Velasco M. Navarro R. Observaciones Clínicas en la Evaluación de Algunos Parámetros Productivos en Engorda de Cerdos Inmunizados Contra *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* y *Mycoplasma hyopneumoniae*. Memorias XXVI Congreso Nacional. AMVEC

- Editores: Gomez M M. Abreu S. Patrón R. Vimifos de Sonora. Mérida, Yucatán.México. 1991. 63-166.
18. Eichwald C. Micoplasmosis de los Animales. Ed. Acribia. España. 1973.
19. Estrada RR. Control de la Neumonía Mediante Vacunación y/o Medicación e Impacto Económico. Memorias. Primer Ciclo Nacional. Afecciones Respiratorias del Cerdo. Editores: Ciprián. Mendoza. García M. Mérida, Yucatán México. 1994, 66-72
20. Estrada RR. Papel de *Mycoplasma hyopneumoniae* en la Enfermedad del cerdo. En: Avances en Producción Porcina. Editor: Morilla, GA. Ediciones de la AMVEC. México. 1992. 149-159.
21. Estrada RR. Situación Actual y Perspectiva en la Prevención y Control del Síndrome Respiratorio en Cerdos. Temas de Actualidad para la Industria Porcina, Editor: Balconi, R. Midia Relaciones. México. 1996. 233-258.
22. Fiacco. Violet. Et, all. Comparison of Media for Isolations of *Ureoplasma urealyticum* and Genital *Mycoplasma* Species. Journal of Clinical Microbiology. Nov. 1984, p 862 – 865.
23. Finegold SM. Baron EJ. Diagnóstico Microbiológico. 7ª Ed. Médica Panamericana, Argentina. 1996. 180-190.
24. Freundt EA. Edward DG. The Mycoplasmas, tomo I, capítulo I. Academic Press New York, USA. 1979.
25. Fuentes M. entendiendo el complejo respiratorio porcino. Ganadería Porcina e campo.com Venezuela. 2000.

26. García RO. Lobo MG. Enfermedades de los Cerdos. Curso de especialización en producción animal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Ed. Trillas. UNAM. México, 1989.
27. Gerald W. Phan R. Ross R. Differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. fluculare* y *M. hyorhinis* on the basis of amplification of a 16S rRNA gene sequence. Am. J. Vet. Res. Vol. 55, No 1. January 1994.
28. Gutierrez B. Cruz ST. Aguilera C. Ciprián C. Correlación entre las Pruebas de Inmunofluorescencia Directa e Inmunoperoxidasa Directa para la Detección de *Mycoplasma hyopneumoniae*. 10° Foro de Investigación Multidisciplinaria. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. UNAM. México 1996.
29. Gyles CL. Thoen CO. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 2ª Ed. USA 1993. 297-310.
30. Hernandez GF. Ensayo de una Prueba Serológica de ELISA para el Diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Tesis de licenciatura. FES Cuautitlan. UNAM. 1997.
31. Hsu T. Minion C. Identification of the Cilium Binding Epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 Adhesin. Infection and Immunology. USA. 1998.4762-4766.
32. Katoh T. Sakai J. Effect of a Combination of Antimicrobial Agent for the Treatment of Respiratory Disease in Cattle. Journal of Veterinary Medical Science. USA. 1996. 58 (8) 783-785.

33. León SC. Cruz ST. Ciprián C. Detección de *Mycoplasma hyopneumoniae* en Tejido Pulmonar de Cerdos por la Prueba de Inmunoperoxidasa Indirecta. Reunión Nacional de Investigación Pecuaria Morelos 96. Cuernavaca Morelos, México 1996.
34. Levinson WE. Jawetz E. Microbiología e Inmunología. El Manual Moderno. México 1992. 479-487.
35. Mac Faddin. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. 1ª reimpresión. Médica Panamericana. México, 1990.
36. Mendoza S. Pijoan C. Tonemorell (2000). The PCR as a tool for detection respiratory microorganism in pigs. Proceedings International Pig Veterinary Society Congress, 16<sup>th</sup> Melbourne, Australia. 449
37. Monroy AM. Carreón NR. Doporto DJ. Gutierrez PJ. Estudio seroepidemiológico de *Mycoplasma hyopneumoniae* Mediante la Técnica de ELISA Tween 20. Tecnología Avipecuaria. México. 1996. Año 8. No. 86:31-38,
38. Ortega Leyva. L.M, García Vázquez S, Cruz Sánchez T. Manual de Practicas de Microbiología Veterinaria. Recolección y Envío de Muestras a Laboratorio de Diagnostico Veterinario, p 14 - 15
39. Pérez MJ. Vázquez MJ. Procedimientos de Laboratorio para Bacteriología y Micología Veterinarias. FMVyZ, UNAM. México. 1989. 188.
40. Pijoan C. *Mycoplasma hyopneumoniae* infections: interactions with other organisms. Vet. Reporst Solvay. USA. 1990. 3:3, 1-4.

41. Ponce HC. Cultivo, Aislamiento y Caracterización de *Mycoplasma hyopneumoniae* en Pulmones Neumónicos de Cerdo. Tesis de licenciatura. FES Cuautitlan. UNAM. México. 1986.
42. Prontuario de Especialidades Veterinarias. 16<sup>a</sup> edición. 1996.
43. Ross RF. Debey MC. Ciliostasis and Loss of Cilia Induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in Porcine Tracheal Organ Cultures. *Infection and Immunology*. 1994. 62 (12) 5312-5318.
44. Ross RF. Mycoplasma disease. In: Disease of Swine. Edited by: Leman. D, A. and Straw, E. B. 7<sup>a</sup> ed. Iowa State University. Iowa USA, 1992.
45. Sarradel J. Et, all. A Morphologic and Immunohistochemical Study of the Bronchus – Associated Lymphoid Tissue of pigs Naturally Infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. 2003; 40:395 - 40
46. Scalan CM. Introducción a la Bacteriología Veterinaria. 199-204. 1<sup>a</sup> Ed.. USA, 1990.
47. Sheldrake RF. Romalis LF. Evaluation of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* Antibody in Porcine Serum. *Australian Veterinary Journal*. 1992.69:10, 255-258.
48. Sitjar M. Noyes E. Moreso JM. Fernández de Aragón J. Pijoan, C. Relationship Between Respiratory Pathogen Seroconversion and Lung Lesion in Pigs. *Proceeding of the 13th IPVS Congress*. 1994.134.
49. Sorensen V. Barfod K. Feld C. Evaluación of a Monoclonal Blocking ELISA and IHA for Antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae* in SPF-pig Herds. *Veterinary Record*. 1992.130, 488-490.

50. Suvaxyn M. hyo. Solvay Duphar Veterinary. 1990-1995.
51. Velasco, JM. Inmunización Contra Enfermedades del Aparato Respiratorio. En: Avances en Producción Porcina. Editor: Morilla, G.A. Ediciones de la AMVEC. México 1992. 98-99.
52. Villegas CL. Manual de Aplicación Clínica de los Quimioterápicos (antibióticos) en la Medicina Veterinaria. Tesis de licenciatura. FES Cuautitlan. UNAM. México. 1994.
53. Weiss, DL. Peterson G. Bacterina contra *Mycoplasma hyopneumoniae*. Estudios de Eficacia en el Campo. Memorias XXVI Congreso Nacional AMVEC. Editores: Gomez M; Abreu S. y Patrón, R. Vimifos de Sonora. Mérida, Yucatán. México. 1991. 179-189.
54. Yagihashi T Kazama, S. Tajima M. Seroepidemiology of Mycoplasmal Pneumonia of Swine in Japan as Surveyed by an Enzyme-linked Immunosorbent Assay. Veterinary Microbiology. USA. 1993.34: 155-166.
55. Zhang Q. Young TF. Ross RF. Glycolipid Receptors for Attachment of *Mycoplasma hyopneumoniae* to Porcine Respiratory Ciliated Cells. Infection and Immunity. USA. 1994. 62:10, 4367-4373.