

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA  
SALUD ANIMAL**

**“EFECTO DEL INMUNOMODULADOR RS-100 EN LA  
RESPUESTA INMUNE DE CERDOS DESAFIADOS CON  
*Mycoplasma hyopneumoniae*”**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:  
ALEYDA ROMERO DIAZ**

**TUTOR PRINCIPAL:  
DR. ABEL CIPRIÁN CARRASCO**

**COTUTOR:  
SUSANA E. MENDOZA ELVIRA**

**COMITÉ TUTORAL:  
DR. TONATIUH CRUZ SÁNCHEZ  
DR. ALFREDO SAHAGÚN RUÍZ**

**MÉXICO D. F.**

**2007**



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.

**JURADO**

DR. ALFREDO SAHAGÚN RUÍZ

DRA. SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA

DR. TONATIUH ALEJANDRO CRUZ SÁNCHEZ

DR. VICTOR RUBEN TENORIO GUTIERREZ

DR. JOSÉ ABEL CIPRIÁN CARRASCO

" AQUEL QUE QUIERA CONSTRUIR TORRES  
ALTAS, DEBERÁ PERMANECER LARGO TIEMPO  
EN LOS FUNDAMENTOS "

Anton bruckner

A DIOS, AGRADEZCO POR PERMITIRME LLEGAR HASTA EL DÍA DE HOY, POR LA SABÍDURIA, LA ESPERANZA Y FORTALEZA PARA CONDUCIRME

AGRADEZCO A TODOS Y CADA UNO DE LOS DOCTORES QUE AYUDARON PARA QUE ESTE TRABAJO FUERA POSIBLE, Y AL PERSONAL ADMINISTRATIVO, TÉCNICO Y DE LABORATORIO POR SU APOYO DESINTERESADO.

A LOS SUS SCROFA DOMESTICUS, DOY GRACIAS POR PERMITIRNOS DESARROLLAR ESTA INVESTIGACION.

Al Dr. Abel Ciprián Carrasco, por su confianza, conocimientos y consejos para realizar este trabajo.

A la Dra. Susana Mendoza Elvira, por sus enseñanzas, amistad y apoyo incondicional.

Al Dr. Jesús Horacio Lara Puente, por la ayuda en la ejecución del diseño experimental de este trabajo, sus conocimientos, confianza y amistad.

A los integrantes del laboratorio de virología, MVZ. David Trujillo, Sr. Gabino Sánchez por su colaboración en este trabajo.

Mis agradecimientos para todos y cada uno de ustedes

## **INDICE**

Introduccion

Entorno politico economico y social 1920 34

Antecedentes

Poder militar

Apoyo campesino obrero y cultural

Partidos politicos

Conflicto Iglesia Estado

Economia

Relaciones externas

Rafael Ramirez

Origen y vida familiar

Estudios

Elemental

Normal

Autodidacta

Influencias

Educadores del siglo XIX

Nuevos metodos en el siglo XX

Ideología

Su contribucion a la escuela rural mexicana

Misiones Culturales

Escuelas rurales

Obra escrita

La etapa final

Balance conclusiones

Fuentes y bibliografía



## RESUMEN

La neumonía enzoótica (NE) es una enfermedad causada por *Mycoplasma hyopneumoniae*, también forma parte del Complejo Respiratorio Porcino (CRP), que se caracteriza por la presencia de tos crónica, pérdida de peso, baja conversión alimenticia y baja mortalidad.

El *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mh) es una etiología compleja en la transferencia de inmunidad, por lo cual se analizó la respuesta inmune y se estudió el efecto del inmunomodulador RS-100 en lechones vacunados y no vacunados contra Mh y desafiados con Mh. Con objeto de: evaluar los parámetros clínicos durante el proceso infeccioso, y mediante la técnica de ELISA se midió el nivel de anticuerpos de los cerdos, y se evaluó el perfil total y diferencial de células blancas, también se evaluó el porcentaje de lesión neumónica con la técnica de planimetría, ocasionadas por *Mycoplasma hyopneumoniae*, y se identificó a el agente etiológico mediante aislamiento.

En la metodología se utilizaron: Diez y seis lechones de 21 días de edad libres de *Mycoplasma*, el inóculo de la cepa SJ-01 de *Mycoplasma hyopneumoniae*, la vacuna comercial contra *Mycoplasma hyopneumoniae*, y el inmunomodulador RS-100.

El diseño experimental: Se formó por 4 grupos, de 4 lechones cada uno, asignados aleatoriamente: el grupo A, control negativo/positivo sin inoculaciones y posteriormente desafiado con Mh; grupo B, tratado con inmunomodulador RS-100 y desafiado con Mh; grupo C, vacunado contra Mh y posteriormente desafiado con Mh; grupo D, tratado con inmunomodulador RS-100, vacunado, y posteriormente desafiado con Mh.

Los lechones se observaron diario por 15 minutos, durante todo el experimento registrando los cambios clínicos y constantes fisiológicas.

Inicialmente se determinó que los lechones no tenían anticuerpos de Mh, y posteriormente con la técnica de ELISA se midió el perfil de anticuerpos.

Se sacrificaron los lechones al finalizar el experimento para medir el porcentaje de lesión neumónica mediante planimetría, se tomaron muestras de pulmón para reaislamiento del agente mediante cultivo bacteriológico.

Los resultados se evaluarán mediante la prueba estadística de t de Student y Análisis de Varianza.

## ABSTRACT

*Mycoplasma hyopneumoniae* (Mh) is the primary pathogen of enzootic pneumonia (EP) in pigs. This disease is associated with the porcine respiratory diseases complex (PRDC) your disorder characterized by slow growth, decreased feed efficiency, lethargy, anorexia, fever, cough, dyspnea and little mortality.

*Mycoplasma hyopneumoniae* is a complex etiology in the immunity transference, how else is analyzed your immunology response applying an immunomodulator in study of RS-100 on vaccinated and non vaccinated pig and challenged.

The objectives of this study were: 1).- Evaluated the clinical parameters during process of the investigation; 2).- Measure antibodies level with the test by an Enzyme-Linked Immunosorbent assay (ELISA) ; 3).- Analysis of the grade of lung lesions with the technique of table organization (Planimetría); 4).- Identifiel by antigen detection or isolation.

Sixteen piglets by 21 days and available of *Mycoplasma*, the strain utilized SJ-01, Mh vaccine and RS-100 immunomodulator.

The pigs were divided into four groups of four pigs at random: Group A, pigs were used as negative/positive controls, Group B, pigs received immunomodulator RS-100 and Mh after challenge in chamber of aerosols, Group C, vaccinated and challenge with Mh, and Group D, received RS-100, vaccinated and Mh after challenge.

Lung lesions observed in pigs infected with Mh are of lung consolidation occurring in the cranioventral areas of the lung, in contrast to groups what received RS-100 with lesions small.

The antibodies were detected by an ELISA test and finished was isolated the *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Data were subjected to analysis of variance and test of student, and were not significant differences in levels of antibodies between any, lung lesions grade, weight gain, and leucocytes count, of the groups.

These results suggest that the application of the immunomodulator RS-100, increase always improvement in the infection response with *Mycoplasma hyopneumoniae*.

## 1.1. INTRODUCCIÓN

La neumonía enzoótica (NE) es una enfermedad causada por *Mycoplasma hyopneumoniae* que se caracteriza por la presencia de tos crónica, pérdida de peso y una baja mortalidad (García y Lobo, 1989), esta enfermedad también forma parte del Complejo Respiratorio Porcino.

Modificaciones en los sistemas de producción, como el flujo todo dentro- todo fuera y producción en sitios (segregación), han ocasionado cambios en la epidemiología de la enfermedad (Fano, 2007), estos cambios consisten en variaciones en la dinámica de la infección del agente, la cuál esta fuertemente influenciada por el tipo de flujo animal.

La enfermedad aparece por lo regular en lechones de 3 a 10 semanas de edad y se disemina lentamente, también se puede manifestar en cerdos de crecimiento y finalización presentando una neumonía crónica con alta morbilidad y baja mortalidad, con los signos clínicos de tos crónica seca, disnea, anorexia, depresión o fiebre acompañada de una baja tasa de crecimiento y poca eficiencia alimenticia, la mortalidad por lo regular se asocia con otros agentes como *Pasteurella*, *Haemophilus*, virus de PRRS, etc (Thacker y col., 1998; Morilla, 2005).

El *M. hyopneumoniae* coloniza el epitelio ciliado del área traqueobronquial donde permanece por largos períodos ocasionando destrucción de las vellosidades respiratorias induciendo falla en la remoción bacteriana y provocando una inmunosupresión (Thacker, 2004), las lesiones típicas son zonas de consolidación roja y gris, infiltraciones celulares mononucleares e hiperplasia del epitelio bronquial.

El proceso inmunológico que sigue a la colonización podría reducirse mediante la aplicación de inmunomoduladores para modificar el comportamiento de los linfocitos del tejido linfoide asociado a los bronquios. En este estudio se evaluará el efecto del inmunomodulador RS-100 en cerdos desafiados con *M. hyopneumoniae*, vacunados y no vacunados. Esta evaluación consistirá en medir el perfil de anticuerpos con la técnica de ELISA, y determinar las poblaciones de glóbulos blancos.

## 1. 2. ANTECEDENTES

### 1.2.1 ETIOLOGÍA

El *M. hyopneumoniae* es un organismo procariote que pertenece a la clase Mollicutes, no posee pared celular por lo cual es pleomórfico, mide 0.2 µm de diámetro en promedio. Está rodeado por una membrana simple de 10 nm de grosor, en la superficie externa de la membrana plasmática se encuentra una cápsula compuesta de polisacáridos, ultraestructuralmente se observa una capa compacta compuesta de proteínas las cuales le confieren al micoplasma una porción hidrófoba que favorece la adherencia a las células respiratorias, también posee otra capa más externa compuesta por carbohidratos. No sobrevive a la desecación más de una semana, sobrevive en agua estancada por varios días, a bajas temperaturas (2 – 7 ° C) lo que explica la transmisión aerógena (Andrade y col., 2003).

### 1.2.2 HUESPED Y TRANSMISIÓN

La principal forma de transmisión de *M. hyopneumoniae* es la que se da por contacto directo, cerdo a cerdo, otra forma importante de transmisión, es la que se da de las cerdas a los lechones durante la lactancia (Fano, 2007). La transmisión vertical ocurre cuando los lechones recién nacidos son infectados por hembras portadoras; en la horizontal, los cerdos son infectados por otros cerdos (Epperson, 2002) o bien la transmisión por vía aérea, por aerosoles (Cruz y Ciprián; 2004).

### 1.2.3 PATOGENIA

El período de incubación de la Neumonía Enzoótica (NE), así como el período activo de la enfermedad con manifestación de signos clínicos dependen de la exposición de los animales susceptibles y de la virulencia de la cepa de *M. hyopneumoniae*. Los cerdos desarrollan lesiones pulmonares evidentes entre los 7 y 10 días después de la infección.

La infección se origina frecuentemente cuando los lechones que poseen anticuerpos maternos son trasladados a las naves de engorda después del destete. Así, los lechones están inicialmente protegidos en estas naves, pero al perder los anticuerpos maternos

quedan expuestos a los aerosoles contaminados con *M. hyopneumoniae* de los animales de mayor edad que permanecen en la nave. Una vez que estos cerdos susceptibles se infectan con *M. hyopneumoniae*, este se adhiere al epitelio ciliado de las vías respiratorias.

Con el tiempo, el agente causal se multiplica y avanza por el árbol bronquial (Andrade y col., 2005).

La adhesión de *M. hyopneumoniae* al epitelio respiratorio es un fenómeno que, resulta de gran importancia en la patogenia de la enfermedad, ya que es el grado de adherencia el que determina la patogenicidad de las diferentes cepas.

La adhesión del *M. hyopneumoniae* a los cilios de las células epiteliales provoca su pérdida, comprometiendo el mecanismo de defensa. El daño celular se atribuye, a una competencia metabólica entre el agente patógeno y la célula epitelial. La muerte celular y su descamación provocan, una hiperplasia epitelial que intenta reparar la pérdida de las células (Kobisch y Friis, 1996); (Rodríguez, 2004).

#### 1.2.4 SIGNOS CLINICOS

Los primeros signos clínicos que se observan en infecciones naturales agudas son anorexia, respiración con soplo, hipertermia moderada e inapetencia, aunque en algunos casos la tos es posiblemente el único signo apreciable en las primeras fases de la enfermedad. Su aparición es lenta, comienza a partir de los 6 días posinfección, con un pico a los 27 días y prácticamente desaparece a los dos meses (Ciprián y col., 2001). En otros casos, la tos aparece en la fase crónica de la enfermedad y se hace persistente. La tos se caracteriza por ser seca e improductiva, pudiendo estar acompañada por estornudos aunque los movimientos respiratorios sean normales y resulta especialmente característica cuando se mueven los animales tras un período de reposo. Estos signos clínicos se pueden observar en el 30 – 70 % de los animales.

Según evoluciona en su forma los signos van desapareciendo, primero la hipertermia y en algunos casos la tos, observándose un retraso en el crecimiento, pelo hirsuto y opaco con baja conversión alimenticia y por lo tanto pérdidas económicas (Epperson, 2002), pudiendo ser éstos los únicos indicadores de la presencia de la Neumonía Enzoótica.

Otros signos relacionados con la infección de *M. hyopneumoniae* son poco frecuentes, aunque algunos trabajos hacen referencia, en inoculaciones con cepas de campo a artritis, cojera y lesiones serofibrinosas relacionadas con la virulencia de las cepas utilizadas.

#### 1.2.5 LESIONES

En la forma aguda *M. hyopneumoniae* ocasiona lesiones que a la necropsia se observan como zonas de consolidación roja craneoventralmente en los pulmones (Trigo, 1998), aumento de tamaño de nódulos linfáticos mediastínicos y bronquiales, zonas de consolidación gris en la forma crónica, exudado catarral en bronquios (Ciprián y col., 2001).

Microscópicamente las lesiones incluyen inflamación y congestión de capilares de los tabiques alveolares, acumulación de polimorfonucleares en la lamina propia de bronquiolos, acumulación linfoide alrededor de bronquios y bronquiolos mientras que los alveolos pulmonares contienen gran cantidad de células mononucleares grandes, polimorfonucleares, linfocitos y células plasmáticas; también se observa pérdida de cilios (Trigo, 1998); hiperplasia del epitelio bronquiolar con proliferación de neumocitos tipo II, hipertrofia de glándulas bronquiales y presencia de exudado de células mononucleares en vías respiratorias (Taylor, 2000).

#### 1.3. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Se han desarrollado y utilizado técnicas inmunohistoquímicas para demostrar la presencia de *M. hyopneumoniae* en tejido pulmonar como son, la Inmunofluorescencia Directa (IFD), y la Inmunoperoxidasa indirecta (IPI).

#### 1.4. INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA

La IFD se basa en la utilización de un anticuerpo policlonal conjugado con un fluorocromo sobre cortes de tejido pulmonar en congelación, obtenidos en zonas de pulmón sanas y de zonas con la lesión característica de la NE. Esta técnica es útil en el diagnóstico de la fase aguda de la enfermedad, cuando existen grandes cantidades de micoplasmas en el pulmón; pero la presencia del *M. hyopneumoniae* en la lesión no excluye la presencia de otros agentes ni determina si el proceso es agudo o crónico; además en procesos crónicos pese a obtenerse las muestras de lesiones neumónicas claras no siempre se puede demostrar la

presencia de *M. hyopneumoniae* en la lesión, porque el número de micoplasmas desciende, a medida que el proceso se hace crónico.

#### 1.4.1. INMUNOPEROXIDASA INDIRECTA

La técnica de Inmunoperoxidasa indirecta fue aplicada por primera vez para el diagnóstico de *M. hyopneumoniae* sobre cortes de tejido pulmonar fijados en formol e incluidos en parafina. La sensibilidad de Inmunoperoxidasa sobre cortes de parafina es muy alta, pero plantea el mismo problema que la IFD en casos crónicos.

Actualmente la mayoría de los laboratorios trabajan con métodos serológicos para detección de anticuerpos; estos métodos permiten muestrear un gran número de animales y conocer con exactitud la prevalencia de la enfermedad, dentro de una explotación; así como el momento de la exposición al agente. Permiten también comprobar la eficacia de los programas de control, de vacunación y junto con el diagnóstico anatomopatológico evaluar los programas de erradicación. Entre los principales métodos serológicos utilizados están, Inhibición de la Hemoaglutinación (HI), Fijación de Complemento (FC), y Ensayo Inmunoenzimático Ligado a Enzima (ELISA). Entre todos estos la más utilizada es ELISA, por su capacidad para procesar grandes volúmenes de muestras.

#### 1.4.2. INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN

La HI tiene alta especificidad y sensibilidad pero su ejecución no es fácil para todos los laboratorios por lo que no se realiza en forma rutinaria. A partir de lavados pulmonares detecta todas las clases de inmunoglobulinas, aunque de forma más marcada las IgA; es útil en el diagnóstico de infecciones tempranas.

#### 1.4.3. FIJACIÓN DE COMPLEMENTO

La FC es una técnica con alto grado de sensibilidad y especificidad, los anticuerpos específicos a *M. hyopneumoniae* se detectan a las dos semanas postinfección, pero no se detectan pasados cinco meses postinfección. Además presenta otra desventaja detecta IgM que sólo se produce al inicio de la infección.



#### 1.4.4. ANÁLISIS INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMA (ELISA)

La técnica de ELISA tiene un alto grado de sensibilidad y especificidad. Además de IgM detecta IgG; que son los anticuerpos que permanecen más tiempo en suero, lo que la hace más ventajosa que la FC. Se utiliza una ELISA de “bloqueo” por ser la que minimiza los problemas de reacciones cruzadas con otros micoplasmas, basado en la utilización de un anticuerpo monoclonal contra la proteína de 74 kDa. de *M. hyopneumoniae*.

La técnica de ELISA detecta anticuerpos desde la 2 ó 3 semanas de contacto con el *M. hyopneumoniae*, el momento de aparición y la tasa de anticuerpos esta en función de la edad a la que se infectan los lechones. En infecciones a las 6 semanas de edad, se detectan anticuerpos a las 3 semanas postinfección alcanzando el pico máximo a las 8 semanas y descienden progresivamente hasta desaparecer al año después de la infección. En animales infectados a las 2 semanas de edad, se detectan anticuerpos a las 2 semanas posinfección, siendo además mayor la tasa de anticuerpos que cuando se infectan a las 6 semanas. En otras pruebas realizadas con la técnica de ELISA se observa que después de infectar animales con 2 semanas de edad aparecen anticuerpos a las 3 semanas de edad produciéndose el pico más alto a las 10 – 12 semanas postinfección y después los anticuerpos van cayendo regularmente. Se puede concluir que en animales infectados en las primeras semanas de vida la técnica de ELISA detecta anticuerpos a las 2 - 3 semanas postinfección alcanzandose la respuesta más alta entre las 8 – 12 semanas postinfección y apartir de aquí decaen hasta desaparecer al año, si no a habido reinfecciones durante ese período.

#### 1.4.5. AISLAMIENTO DE *MYCOPLASMA*

El aislamiento y cultivo de el *M. hyopneumoniae* se realiza a partir del tejido pulmonar y de moco traqueal, para esto es necesario contar con material, equipo y la técnica necesaria para su cultivo siendo necesarias varias semanas para su aislamiento e identificación. (Friis, 1975).

La presencia en pulmón de otros micoplasmas de crecimiento más rápido, como el *M. hyorhinis*, dificulta el aislamiento y la identificación de el *M. hyopneumoniae* y en estados crónicos de la enfermedad, cuando los resultados con otras pruebas de diagnóstico tales

como IFD o ELISA son negativos, deberán ser confirmados mediante la técnica de cultivo o PCR.

## 1.5. INMUNIDAD

### 1.5.1. Inmunidad del lechón

Los glóbulos blancos (leucocitos) del cerdo son responsables de la inmunidad. Pueden salir del torrente sanguíneo y entrar a los tejidos del cuerpo cuando son llamados para ubicarse y ahí atacar a células extrañas.

La cantidad de glóbulos blancos presentes en la sangre puede variar ampliamente, incluso en cerdos normales. Existen 5 tipos básicos de leucocitos: los linfocitos, los monocitos, los neutrófilos, los eosinófilos y los basófilos

En la médula ósea se producen los linfocitos inmaduros y se dirigen a los órganos primarios el timo y la médula a instruirse. Los linfocitos maduros como célula B ó T van a las zonas B y T de los órganos linfáticos secundarios (nódulos linfáticos y bazo). Es aquí donde los linfocitos auxiliados por los macrófagos reconocen los antígenos e inician la respuesta inmune (Pastoret, 1998).

### 1.5.2. Linfocitos T

En sangre periférica circulan subpoblaciones de linfocitos, que representan del 40 al 70 % de los glóbulos blancos, los diversos tipos de linfocitos desempeñan papeles específicos en la inmunidad; existen células T aproximadamente (55 %) que pueden ser reconocidos por los antígenos de superficie CD3, TcR, CD4 y CD8.

Los linfocitos T regulan el ataque de los glóbulos blancos contra los agentes infecciosos, cada linfocito T reconoce y reacciona sólo ante un antígeno específico.

Los linfocitos T cooperadores controlan a las células B, en lo que a la producción de anticuerpos se refiere, y ayudan a otros glóbulos blancos a atacar con mas agresividad a los patógenos invasores.

Las células T citotóxicas atacan y destruyen a las células infectadas por virus o a las células cancerosas, estas células necesitan aproximadamente dos semanas para ser efectivas después de la primera exposición a un antígeno, pero actúan rápidamente después de la siguiente exposición.

Las células T supresoras están relacionadas con las células T citotóxicas. Estas deciden cuándo ha desaparecido la amenaza y ordenan que se interrumpa la acción. Sin su ayuda, el aparato inmunocompetente quedaría fuera de control y dañaría a las células sanas.

Las células T de memoria permanecen en el cuerpo después de que ha desaparecido la infección, listas para defender con más fuerza la siguiente vez que aparezca el patógeno.

### 1.5.3. Linfocitos B

También se encuentran células B (15 %) que poseen inmunoglobulinas en la superficie y receptores para el complemento; aproximadamente el 30 % de los linfocitos no son T ni B y corresponden a la subpoblación de células Null o K (Ramírez y Pijoan, 1982).

Cada linfocito B que se diferencia en célula plasmática en la médula ósea está programado genéticamente para sintetizar un solo tipo de Ac, a la espera de contactar con el Ag específico. Tras su primer contacto con el Ag específico, cada linfocito B se multiplica y diferencia hasta dar un clon de células plasmáticas, que fabrican y excretan grandes cantidades del Ac específico para él que estaba programado el linfocito original. A este fenómeno se le conoce con el nombre de expansión clonal (Sánchez-Vizcaíno, 2004).

Los linfocitos B fabrican los anticuerpos que luchan contra los antígenos producidos por los patógenos. Cada linfocito B reconoce sólo a un antígeno específico y elabora los anticuerpos que se uniran exclusivamente a dicho antígeno.

### 1.5.4. Anticuerpos en el cerdo

Los anticuerpos (inmunoglobulinas o IgS) son proteínas elaboradas por las células B en respuesta a los antígenos, los anticuerpos se localizan en sangre y en algunos otros fluidos corporales (por ejemplo en el moco) adhiriéndose a los antígenos que sean exactamente iguales a los que indujeron su formación. Los principales tipos de anticuerpos son las IgM, IgG, IgA e IgE (Motaraz, 1992).

Las IgM aparecen en la sangre dentro de 5 a 7 días después de la primera exposición al antígeno. Molécula muy grande que permanece en el torrente sanguíneo mientras no se dañen los vasos sanguíneos, en cuyo caso salen y se dirigen hacia los tejidos corporales.

Las IgG aparecen de 7 a 14 días después de que el cerdo se expone por primera vez a un antígeno. La cantidad de IgG en la sangre se incrementa rápidamente después de que el cerdo se expone al antígeno nuevamente (mediante vacunaciones de refuerzo o por la enfermedad en sí). Debido a que las IgG son más pequeñas que las IgM, pasan con más facilidad a los tejidos. Las IgG también se encuentran en los pulmones y en el calostro.

Las IgA se encuentran principalmente en las superficies mucosas (tracto respiratorio, intestino, tracto reproductor). Evitan que los patógenos invadan a las mucosas y se desarrollen en ellas. La leche de la cerda contiene IgA.

Las IgE en cerdos sólo se encuentran en pequeñas cantidades en el cuerpo. La mayoría se encuentran ligadas a las células cebadas en los tejidos corporales. Las IgE protegen a los tejidos contra algunos tipos de parásitos y son las responsables de los tipos de alergia y del encuentro con los antígenos (Sánchez-Vizcaíno, 2004).

#### 1.5.5. Monocitos

Los Monocitos representan aproximadamente el 5 % de los glóbulos blancos circulantes. Se movilizan hacia los tejidos corporales y se convierten en macrófagos, células que fagocitan y destruyen a las bacterias o a los hongos.

#### 1.5.6. Macrófagos

Los macrófagos juegan otro papel importante, que consiste en recolectar a los antígenos y presentarlos en su superficie de tal manera que los linfocitos puedan responder a los antígenos.

#### 1.5.7. Neutrófilos

Los neutrófilos constituyen del 20 al 60 % de los glóbulos blancos de un cerdo normal. Su número incrementa dramáticamente cuando el organismo se enfrenta a una infección

bacteriana en el torrente sanguíneo. Los neutrófilos son células que comienzan a ingerir y matar a las bacterias unos minutos después de que éstas entran al cuerpo del cerdo.

#### 1.5.8. Eosinófilos

Los eosinófilos constituyen del 1 al 8 % de los glóbulos blancos presentes en la sangre, la cantidad de eosinófilos circulantes aumenta en los cerdos que tienen infecciones parasitarias.

#### 1.5.9. Basófilos

Los basófilos forman sólo del 1 al 2 % de los glóbulos blancos del cerdo. Los basófilos contienen histamina y algunas otras sustancias que crean síntomas de alergia y anafilaxia (Roth, 2002).

Enfermedades respiratorias como la micoplasmosis se encuentra diseminada por todo el mundo con una incidencia de 20 a 80 % en las diferentes poblaciones porcinas. En México estudios realizados por investigadores reportan incidencias similares de 30 a 80 % en animales sacrificados y revisados en rastro (Díaz, 1999) o bien en granjas (Hirose, 2001). Inicialmente en infecciones por *M. hyopneumoniae* la respuesta inmune celular es muy marcada sin embargo estudios sobre el sistema inmune porcino muestran que los lechones en crecimiento tienen baja inmunocompetencia comparada con los cerdos adultos (Mendoza y cols., 2001) por lo que sería importante influir sobre el sistema inmune para disminuir grandes pérdidas que se tienen por esta enfermedad en la industria porcina. Así mismo la vacunación induce protección contra otros micoplasmas y en diferentes especies, sin embargo en la vacunación contra *M. hyopneumoniae* se han tenido resultados poco favorables debido a que la vacunación no confiere una protección duradera (Rapp – Gabrielson y col., 2002; Keith y col., 2002).

### 1.6. VACUNACIÓN

La vacunación sobre todo reduce o incluso evita, en algunos casos, las lesiones pulmonares causadas por *Mycoplasma hyopneumoniae*. Como consecuencia, disminuye el índice de conversión en los animales vacunados en comparación con animales no vacunados,

aportando, la mayoría de las veces, un beneficio económico. El criterio a seguir para recomendar la vacunación en una granja depende de varios factores: el momento de la infección, la presión de dicha infección, el tipo de granja, etc.

La mejor manera de evaluar si la vacunación es rentable es comparar en el rastro el porcentaje de lesiones en los pulmones obtenidos de los cerdos de engorda antes del establecimiento del programa vacunal, con los pulmones obtenidos de los animales vacunados, tomando un número de muestras significativo (Muñoz y col.,1995).

Más práctico y sencillo, pero algo menos fiable, es la comparación a nivel clínico de los problemas respiratorios que se producen en los cerdos en fase de crecimiento, en un mismo período de tiempo, en animales vacunados y no vacunados de la misma granja.

La vacunación puede reducir la neumonía y las pérdidas asociadas a *Mycoplasma hyopneumoniae*. En granjas afectadas gravemente, se ha logrado un rango en el beneficio de hasta 5:1. El momento en que los cerdos se infectan puede determinarse mediante serología y PCR, buscando seroconversión activa y presencia del patógeno en cuestión, en el tracto respiratorio superior. La vacunación debe planificarse atendiendo a estos puntos (Calsamiglia, 1999; Andrada y col., 2003).

Las vacunas inactivadas frente a *Mycoplasma hyopneumoniae* han demostrado ser eficaces en el control de neumonía enzoótica y la reducción de las lesiones pulmonares causadas por dicha infección. No obstante, se ha demostrado que la eficacia de algunas vacunas frente a *Mycoplasma hyopneumoniae* varía enormemente, dependiendo principalmente del adyuvante empleado.

Por otro lado, se ha observado que vacunas oleosas, que contienen aceite como adyuvante en mayor o menor porcentaje, han causado reacciones en el punto de inoculación. El desarrollo de vacunas formuladas con nuevos adyuvantes ha permitido superar estos problemas, asegurándose la inocuidad en los animales y la protección a nivel de campo.

A pesar de que existen diferencias en la capacidad inmunogénica de las distintas cepas de *Mycoplasma hyopneumoniae*, las cepas utilizadas para desarrollar vacunas inactivadas frente a

este microorganismo son, en general, poco inmunogénicas. Esto significa que es necesario formular las vacunas con adyuvantes potentes que proporcionen a la vacuna la capacidad de estimular una elevada respuesta humoral y celular (Espuña y col., 1994).

La formulación de una vacuna frente a *Mycoplasma hyopneumoniae* que contenga la combinación de levamisol y carbómero como adyuvantes proporciona un efecto doble, ya que ofrece una inmunidad más alta y duradera debido a la sinergia de las propiedades de ambos componentes: por un lado, el levamisol es un fuerte potenciador de la inmunidad que estimula la inmunidad humoral y celular, mientras que, por otro lado, el carbómero permite la liberación lenta del antígeno vacunal tras la inoculación. En este tipo de vacuna, la combinación antígeno-adyuvante estimula la producción de anticuerpos contra la infección producida por *Mycoplasma hyopneumoniae* y la respuesta mediada por células es elevada debido principalmente a las propiedades de este particular adyuvante (Euzéby, 1986; Espuña y col., 1994).

Este tipo de vacuna aumenta la respuesta inmune celular, como resultado de la interacción entre el antígeno vacunal y el adyuvante. Este estímulo implica la activación de los macrófagos y los linfocitos B. Los macrófagos alveolares son importantes en la defensa contra la neumonía enzoótica, ya que digieren y presentan los antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae* (estructuras proteicas de la superficie celular) a los linfocitos T, que se convierten en células T cooperadoras activadas y liberan citoquinas para aumentar la capacidad de las células B para producir más anticuerpos. Asimismo, la vacunación estimula la producción de interferón- $\gamma$  (Espuña y col., 1994).

Las ventajas que proporciona el uso de vacunas como método de control son las siguientes:

Inducción de una respuesta inmunológica humoral y celular temprana, antes de que se produzca la infección de los lechones.

Protección duradera a lo largo del período de engorda

Disminución del número y gravedad de las lesiones pulmonares y la sintomatología clínica producidas por *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Aunque la infección se presenta a una edad muy temprana, no existen manifestaciones clínicas de la enfermedad en las primeras semanas de vida del lechón, esto se debe a la protección inmune que le transfiere la madre en las primeras semanas. En tanto que la producción local de anticuerpos se iniciará en el lechón durante las dos primeras semanas de edad y la maduración de linfocitos del cerdo ocurre a partir de la quinta semana de edad, aproximadamente a las 12 semanas la protección materna a declinado y existen efectos negativos derivados por el sistema de producción, manejo, estrés, presión de infección, desarrollandose la infección de los cerdos (Roof and Zuckerman, 2002).

Actualmente se disponen de estrategias frente a la neumonia por *M. hyopneumoniae* estas estrategias incluyen prácticas de manejo, medicación y vacunación.

Los resultados obtenidos mediante el uso de bacterinas y vacunas frente a *M. hyopneumoniae* son variables en términos de minimizar la producción de lesiones neumónicas e incrementar los parámetros productivos (Solleras, 2004) sin embargo su empleo se debe de fundamentar en el costo – beneficio de cada explotación, por otra parte la vacunación para *M. hyopneumoniae* no debe usarse como la única medida frente al CRP (Suárez, 2001).

Recientemente estudios para inducir protección contra la enfermedad clínica y comparar la respuesta serológica de cerdos en la vacunación intradérmica e intramuscular contra *M. hyopneumoniae* indican títulos de anticuerpos significativamente más altos en cerdos vacunados intradérmicamente, donde también hubo menor número de lesiones del pulmón y títulos más altos de inmunoglobulinas IgA e IgG en fluido bronquioalveolar que en los cerdos no vacunados (Jones y col., 2005).

#### 1. 7. Epidemiología de *M. hyopneumoniae*

La vacunación de hembras (pre-parto) en la línea de producción; sería el programa ideal ya que al vacunar solamente a las madres se pueden reducir significativamente los niveles de prevalencia al destete, para la manifestación clínica de la enfermedad. Sin embargo, esto funciona sólo si la transmisión lateral está controlada, como en el caso de sistemas multisitios o en sistemas donde existe un estricto control del movimiento de animales y de personal dentro de las instalaciones.



Con la vacunación de hembras (pre-parto) y de lechones en (maternidad); se pueden lograr considerables reducciones en prevalencia al destete, ya que ataca la excreción del agente de madres y lechones infectados. Sin embargo esto podría ser costoso para granjas comerciales (Pijoan y Fano, 2007).

La vacunación temprana de (lechones) sin intervención en las hembras; enfoque europeo, podría ser exitoso en muchas granjas, pero fallar en otras, dependiendo de los niveles de prevalencia. En granjas con alta prevalencia, antes del destete, esta inducción quizás movilice la enfermedad localizada al final del destete hacia la engorda. En granjas con prevalencia media, esta estrategia funcionaría bien, sin embargo, el resultado variaría mucho entre grupos, los cuales pueden ser muy variables incluso en grupos consecutivos.

La vacunación temprana de (lechones) con tratamiento de antibiótico en las madres; ésta combinación es ideal para granjas comerciales, ya que podría reducir la excreción de *Mycoplasma hyopneumoniae* de las madres por medio del uso de antibiótico efectivo para el control de *Mycoplasma hyopneumoniae*, mientras se reduce también la excreción de los lechones a través de la vacunación. La principal desventaja puede ser el costo-beneficio por lo cuál es necesario hacer una evaluación (Pijoan y Fano, 2007).

Por otro lado los factores de manejo como densidad de población, calidad de aire, ventilación y un programa de limpieza son muy importantes para controlar la aparición de problemas respiratorios.

Sin embargo el método más efectivo y económicamente más rentable es la acción combinada de estas estrategias.

## 1.8. INMUNOMODULADORES

La inmunomodulación consiste en la manipulación del sistema inmunológico a través del uso de sustancias de origen vegetal, animal o sintético; siendo un inmunomodulador capaz de normalizar una respuesta inmune deficiente, inadecuada e hiperactiva propiciando un

buen funcionamiento de los mecanismos de defensa del individuo, el mecanismo de acción de estos productos es la activación de macrófagos y la subsecuente liberación de citocinas las cuales controlan el nivel de respuesta inmune al agente (Ferro, 2007).

Los inmunomoduladores juegan un papel importante en la respuesta inmune del cerdo ya sea para estimular una función o para desestimularla. Los inmunomoduladores son importantes para estimular a edad temprana el sistema inmunológico del lechón con lo cuál es posible hacer que los animales sean menos susceptibles a las enfermedades en periodos vulnerables (Romero y col., 2001); sin embargo también es importante mantener condiciones ambientales adecuadas para asegurar mejoras en el estado general y en su rendimiento.

#### 1.8.1. Uso en animales domésticos

El uso de inmunomoduladores en animales domésticos tiene como objetivos concretos:

- a) La producción de una respuesta más intensa y efectiva contra agentes productores de enfermedades clínicas o subclínicas.
- b) Acelerar la maduración de la inmunidad específica e inespecífica en animales neonatos, jóvenes y susceptibles de infecciones.
- c) Provocar reacciones inmunes intensas en tejidos y órganos invadidos por microorganismos, con la finalidad de incrementar la respuesta protectora en sitios como glándula mamaria, tracto gastrointestinal, tracto respiratorio y genital.
- d) Incrementar la respuesta inmune específica, celular y humoral, después de la vacunación.
- e) Reducir los efectos de la inmunosupresión causada por estrés o agentes infecciosos que interfieren en el funcionamiento de las células del sistema inmune o que producen infección permanente.
- f) La estimulación selectiva de componentes de la inmunidad específica y/o inespecífica que conlleve a una protección contra la replicación de los agentes patógenos.

#### 1.8.2. Características de un Inmunomodulador ideal

Un inmunomodulador ideal debe poseer una serie de características para su uso en animales domésticos:

- a) No debe ser tóxico o pirógeno aún a altas dosis, ni poseer actividad teratogénica, carcinogénica o tener algún efecto adverso a largo plazo.
- b) Si es administrado con vacunas debe poseer un efecto de adyuvante e incrementar la respuesta inmune.
- c) Debe estimular la inmunidad inespecífica frente a patógenos.
- d) Incrementar la respuesta primaria y secundaria a agentes infecciosos.
- e) El compuesto del producto debe ser inactivado o biodegradado en el medio ambiente y no debe excretarse en leche, huevos, etc.
- f) Debe ser activo por vía oral y mantener su estabilidad en agua y alimentos.
- g) Debe ser compatible con otros fármacos incluidos antibióticos y antiparasitarios.

En medicina humana y veterinaria, existen productos comerciales indicados como inmunomoduladores, que se han utilizado con buenos resultados, como inmunoestimulantes o como terapia complementaria al tratamiento de diversas enfermedades (Pappaterra, 2002).

Se han hecho algunos estudios acerca de los inmunomoduladores en humanos, tal es el caso de la determinación de la eficacia de las hormonas tímicas, con la función de aumentar la población de células T ampliando la respuesta inmune en pacientes portadores de SIDA con buenos resultados. El IFN  $\alpha$  activa la resistencia celular antiviral, dificulta la propagación intercelular de los virus, también retarda la replicación del HIV hasta en 90 % in vitro, así mismo se estudio el efecto de varios agentes antivirales e inmunomoduladores en cultivos de células CD4 infectadas con VIH.

En Medicina Veterinaria el empleo de inmunomoduladores en cerdos ha sido limitado; el RS-100 objeto de este estudio, es una sustancia de origen vegetal constituida de un extracto termoestable obtenido de la *Imperata vulgaris* planta originaria del Norte de la República Mexicana (Miranda y col., 2005).

El RS-100 se analizó con diversos tratamientos en animales infectados con PRRSV donde su efecto en general fue supresor, mientras que para los linfocitos CD2+, CD4+ y CD8 su efecto fue nulo y para CD4+ sobre CD8 su efecto fue supresor; en tanto que para los linfocitos CD4+ sobre CD8+ (DP) y células MHC-II, incluyendo células T/ TcR  $\gamma$   $\delta$  existió un efecto estimulante al aplicar vacuna (Sánchez, 2003).

También se reportó la utilización del RS-100 en el tratamiento de micosis crónica originada por *Trichopyton spp*, en un equino donde se obtuvieron resultados positivos mejorando las lesiones, estado de ánimo, disposición de trabajo y en apariencia revirtió la población celular a niveles normales (Miranda y col., 2005)..

## **1.9 JUSTIFICACIÓN**

El *M. hyopneumoniae* por ser un agente inmunosupresor que tiene capacidad de respuesta aumentada de linfocitos que no favorecen la respuesta protectora, ocasiona que el lechón sea más susceptible a la enfermedad crónica favoreciendo la entrada de agentes etiológicos secundarios provocando mala conversión alimenticia, pérdida de peso y mayor tiempo de salida al rastro, trayendo como consecuencia final pérdidas económicas.

Aplicando RS-100 se pretende mejorar la cantidad y calidad de células inmunológicas, estimulando o potencializando su función y efecto sobre el *M. hyopneumoniae*, para aumentar los parámetros productivos y así disminuir las pérdidas económicas.

### **1.10. HIPOTESIS**

Si se aplica el inmunomodulador RS-100 en cerdos infectados con *M. hyopneumoniae* entonces se modificará el porcentaje de lesiones neumónicas y de infiltrado por leucocitos.

## **2. OBJETIVO GENERAL**

Se estudio el efecto del inmunomodulador RS-100 en lechones vacunados y no vacunados y desafiados con *M. hyopneumoniae* .

### **2.1. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Evaluar los parámetros clínicos y de comportamiento mediante observación en todos los lechones durante el proceso experimental.
2. Analizar el nivel de anticuerpos de los lechones por medio de la técnica de ELISA.
3. Analizar la población de células blancas mediante Biometria hemática y conteo diferencial.
4. Evaluar los parámetros productivos de ganancia diaria de peso
5. Evaluar las lesiones macroscópicas (grado de lesión neumónica).
6. Reaislar al agente etiológico.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1. Inoculo de *Mycoplasma hyopneumoniae*:**

Se preparó el inoculo de la cepa de *M. hyopneumoniae* a partir de tejido pulmonar colectado en el rastro, tomando una porción de bronquiolo el cuál se sembro en medio líquido de Friis dejando incubar por 10 días para dejar crecer el *Mycoplasma* hasta observar cambios de coloración de rojo a amarillo ambar, y posteriormente se procedio a realizar de 4 a 6 diluciones logaritmicas, esperando el crecimiento bacteriano, para realizar sembrado en medio sólido de Friis e incubarlo a temperatura de 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>, durante 10 días se observaron diariamente los cambios de color que indicaban el crecimiento de colonias las cuales fueron observadas al microscópio estereoscopio para confirmar la presencia de ellas. Una vez identificadas las colonias de *M. hyopneumoniae* se dividieron los geles en fragmentos de 1 cm<sup>2</sup>, para adicionar de 2 a 3 fragmentos en medio líquido de Friis en matraces de 200 y 500 ml incubandose hasta obtener 1,250 ml. de inoculo, los cultivos se confirmaron con *Mycoplasma hyopneumonia* mediante la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) obteniendose las cepas SJ-01 a SJ-06, el cuál se utilizó para desafiar a todos los cerdos de este diseño experimental, mediante aerosoles en una cámara de nebulización a la concentración de 10<sup>4</sup>/ml. Unidades Cambiantes de Color (UCC) .

#### **3.1. 2. Animales:**

Para este estudio se utilizaron 16 lechones cruza de la raza York shire y Landrace de aproximadamente 21 días de edad procedentes de una granja comercial libre de *M. hyopneumoniae*, los cuales se fueron identificando por medio de aretado y hospedados en cajas de polietileno con bebedero y comedero automático, se adapto una fuente de calor con focos de 200 wats a una altura de 1.5 m, se ofrecio alimento peleteado de fase iniciador, se dividieron en cuatro grupos de cuatro lechones en forma aleatoria, y así se mantuvieron durante 3 días para adaptación y posteriormente la ejecución del diseño experimental.

### **3.1.3. Vacuna comercial de *Mycoplasma hyopneumoniae***

Se aplicó 1 ml de vacuna comercial contra *M. hyopneumoniae*, por vía intramuscular a los cerdos de los grupo C y D los días 0 y 14 de acuerdo al diseño experimental.

### **3.1.4. Inmunomodulador RS – 100**

El inmunomodulador RS-100 derivado de la *Imperata vulgaris*, se aplicó a los lechones de los grupos B y D diariamente, por vía oral con miel de maíz, en cápsulas a razón de 45 mg/cerdo de acuerdo al diseño experimental para medir su efecto sobre la respuesta inmune a *Mycoplasma hyopneumoniae*. El RS-100 fue donado por el Dr. Antonio Salas Muñoz.

### **3.1.5. Diseño experimental**

Para evaluar la respuesta inmune en cerdos no vacunados, vacunados y desafiados con *M. hyopneumoniae*. Se formaron 4 grupos asignando 4 lechones en forma aleatoria:

- GRUPO A. Control negativo (día 0 al 28)/positivo (día 28 al 52) desafiados con *M. hyopneumoniae*.
- GRUPO B. Tratado con una cápsula de RS-100 via oral, diariamente
- GRUPO C. Vacunados contra *M. hyopneumoniae* 1 ml intramuscular (día. 0 y 14)
- GRUPO D. Tratado con RS-100; y vacunación contra *M. hyoneumoniae*.

\* Todos los grupos se desafiaron con *M. hyopneumoniae* el día 28 (ver cuadro 1).



Cuadro 1. Diseño experimental del tratamiento con RS-100, la vacunación, el desafío con *Mycoplasma hyopneumoniae*, y el muestreo sanguíneo.

| Grupos<br>4 lechones/ grupo          | RS-100<br>Día 0 al 52 | Vacunación<br>Mh<br>Días 0 y 14 | Desafío<br>Mh<br>Día 28 | ® Muestreo<br>sanguíneo<br>4 lechones/ grupo |
|--------------------------------------|-----------------------|---------------------------------|-------------------------|--|
| A) Control (-)/(+)                   | NO                    | NO                              | SI                      | SI   |
| B) RS-100                            | SI                    | NO                              | SI                      | SI   |
| C) Vacuna vs <i>M. hyopneumoniae</i> | NO                    | SI                              | SI                      | SI   |
| D) RS-100 y Vacuna Mh.               | SI                    | SI                              | SI                      | SI   |

Mh = *Mycoplasma hyopneumoniae*

RS – 100 = Inmunomodulador, aplicación del día 0 al 52

® = Días de muestreo sanguíneo: 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 y 52

## **3.2. Parámetros a evaluar**

### **3.2.1. Evaluación clínica.**

Los lechones se observaron diariamente, durante 15 minutos para tomar la temperatura durante un minuto con termómetro manual de mercurio, realizando una desinfección del mismo con una solución de cloro al 5 % entre un lechón y otro, empleando dos termómetros por cada grupo durante todo el experimento anotando los cambios clínicos. y de comportamiento, se registraron las constantes fisiológicas de cada uno de ellos y posteriormente se le dio una cápsula de 45 mg/ cerdo de RS-100 vía oral con miel de maíz.

### **3.2.2. Evaluación Serológica.**

Inicialmente se realizó el sangrado basal a todos los lechones, de la vena yugular utilizando tubos vacutainer, para determinar que no había anticuerpos contra *M. hyopneumoniae*; posteriormente se tomaron muestras sanguíneas de 8 ml., los días 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 y 52 para evaluar el perfil de anticuerpos mediante la técnica de ELISA

### **3.2.3. Evaluación del perfil total y diferencial de células blancas**

Para evaluar el perfil de células blancas total y diferencial mediante la técnica de biometría hemática, se procedió a tomar muestras sanguíneas de la vena yugular en tubos vacutainer de 4 ml con EDTA, los días 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 y 52, a todos los cerdos de todos los grupos.

### **3.2.4. Evaluación de lesiones macroscópicas**

Al finalizar el experimento se sacrificaron todos los lechones mediante shock eléctrico y posteriormente exsanguinación, para realizar la técnica de necropsia observando in situ la cavidad pulmonar y luego extraer los pulmones para evaluar las lesiones mediante planimetría anotándose la vista dorsal y ventral en un registro por cerdo (Ciprián, 1987).

### **3.2.5. Identificación del agente etiológico mediante aislamiento**

Se tomaron muestras del tejido pulmonar al momento de la necropsia de todos los lechones, de todos los grupos, depositándose en bolsas de plástico en un termo de refrigeración y fueron transportados al laboratorio de Microbiología de la FES.- Cuautitlán, para sembrar los tejidos en tubos con medio líquido de Friis, y posteriormente resembrar en medio sólido de Friis, y de esta forma re-aislar al *M. hyopneumoniae*.

### **3.2.6. Evaluación de ganancia diaria de peso (GDP)**

Con la finalidad de evaluar la ganancia diaria de peso se procedió a determinar el peso de todos los lechones del diseño experimental cada 5 días, utilizando una báscula comercial de 120 kg, anotándose en los registros.

**3.2.7. Análisis estadístico.** Los datos resultantes de los diferentes grupos de este estudio experimental se evaluaron mediante Análisis de Varianza y t-student.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Evaluación clínica.

En el caso de la temperatura se observó que el grupo C vacunado contra Mh durante la primera semana tuvo una temperatura promedio de 38.5 °C aumentando sucesivamente hasta llegar a presentar una temperatura promedio de 40.06 para la 6ta. Semana al igual que el grupo A, B y D que mantuvieron durante los primeros 28 días una temperatura promedio de 38.05 °C a 39.3 °C, el grupo D aumento a partir de la 4ta. semana hasta llegar a la 6ta. semana con un promedio de 39.83 °C (ver gráfica No. 1).

Gráfica No.1 Temperaturas promedio de los grupos A, B, C y D desafiados con *Mycoplasma hyopneumoniae*.

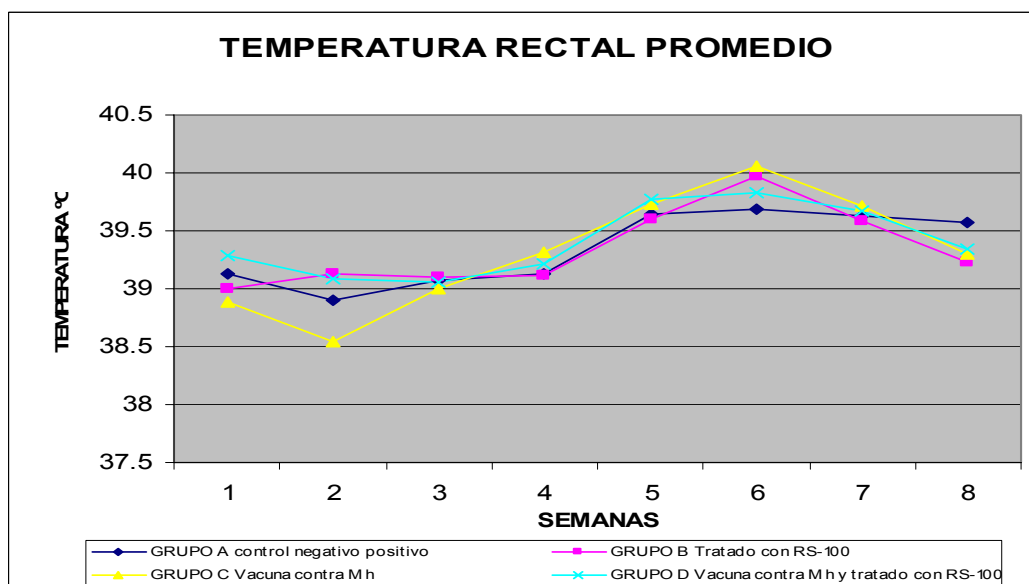


Tabla A Temperatura rectal promedio semanal de los grupos A, B, C, y D desafiados con *Mycoplasma hyopneumoniae*.

| Semanas  | Grupo A    | Grupo B    | Grupo C    | Grupo D    |
|----------|------------|------------|------------|------------|
| 1ra. sem | 39.1285714 | 38.9964286 | 38.8821429 | 39.2892857 |
| 2da. Sem | 38.9       | 39.125     | 38.5464286 | 39.0892857 |
| 3ra. Sem | 39.0785714 | 39.0964286 | 39.0035714 | 39.0592593 |
| 4ta. Sem | 39.1321429 | 39.1142857 | 39.3071429 | 39.2214286 |

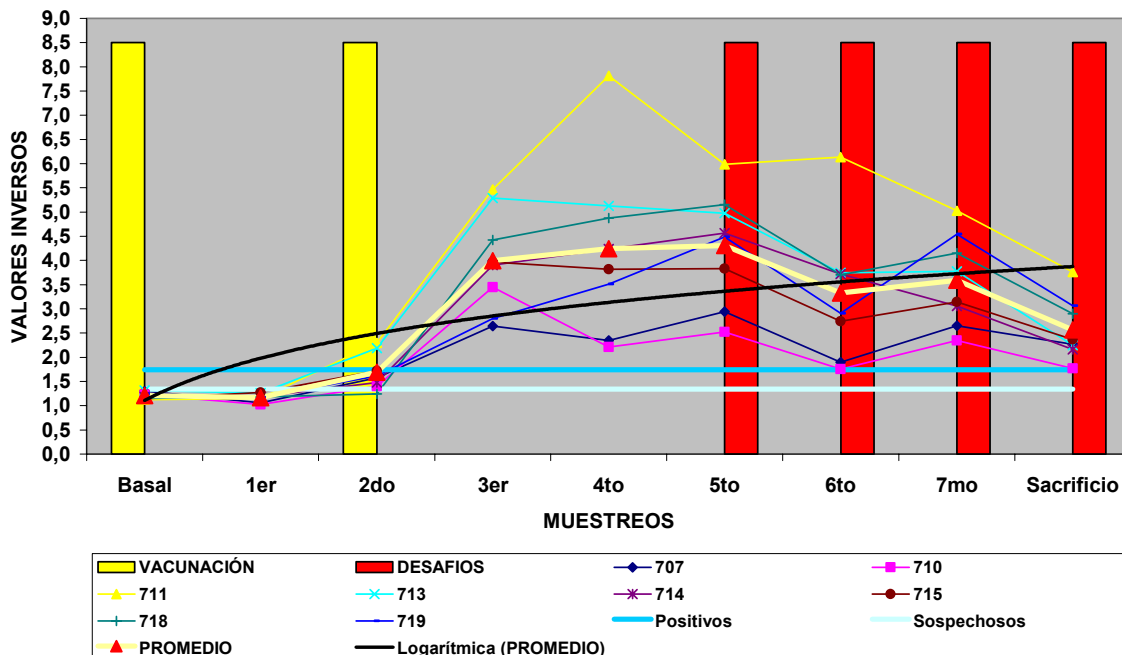
|          |            |            |            |            |
|----------|------------|------------|------------|------------|
| 5ta. Sem | 39.65      | 39.6035714 | 39.7321429 | 39.7714286 |
| 6ta. Sem | 39.6892857 | 39.9785714 | 40.0642857 | 39.8321429 |
| 7ma. Sem | 39.6321429 | 39.5785714 | 39.7214286 | 39.6714286 |
| 8va. Sem | 39.575     | 39.225     | 39.3       | 39.3375    |

#### 4.2. Evaluación Serológica

La gráfica muestra como la curva de anticuerpos se mantiene a partir del sangrado basal y primer vacunación hasta la 2da. vacunación (día 14) en los cerdos de los grupos C y D, a partir de aquí se inicia una elevación del título de anticuerpos en el lechón 711 (Gpo. D) tratado con RS-100 y vacunado contra *Mycoplasma hyopneumonia*, se observó que se mantuvo el título hasta la cuarta semana y disminuyó hasta el 1er. desafío (día 28) manteniéndose en el 2do. desafío y de aquí declina la curva de anticuerpos hasta el 3er. y 4to. muestreo (día 43); en cuanto al lechón 713 (Gpo. C) vacunado sólo contra *M. hyopneumoniae* la curva de anticuerpos se elevó a partir de la segunda vacunación aumentando hasta la tercer semana y manteniéndose hasta el 1er. desafío (día 28), pero disminuyendo para el 2do. desafío (día 33) manteniéndose hasta el 3er. desafío (día 38) y declinando aquí hasta el 4to. desafío y sacrificio. Sin embargo todos los lechones de ambos grupos mostraron tener anticuerpos (ver gráfica No. 2).

Gráfica No. 2 Muestra la curva de anticuerpos de los Grupos C y D (vacunados contra Mh y vacunados contra Mh más tratamiento de RS-100).

**ELISA *Mycoplasma hyopneumoniae*  
DATOS INVERSOS VACUNADOS Y VACUNADOS + RS-100**



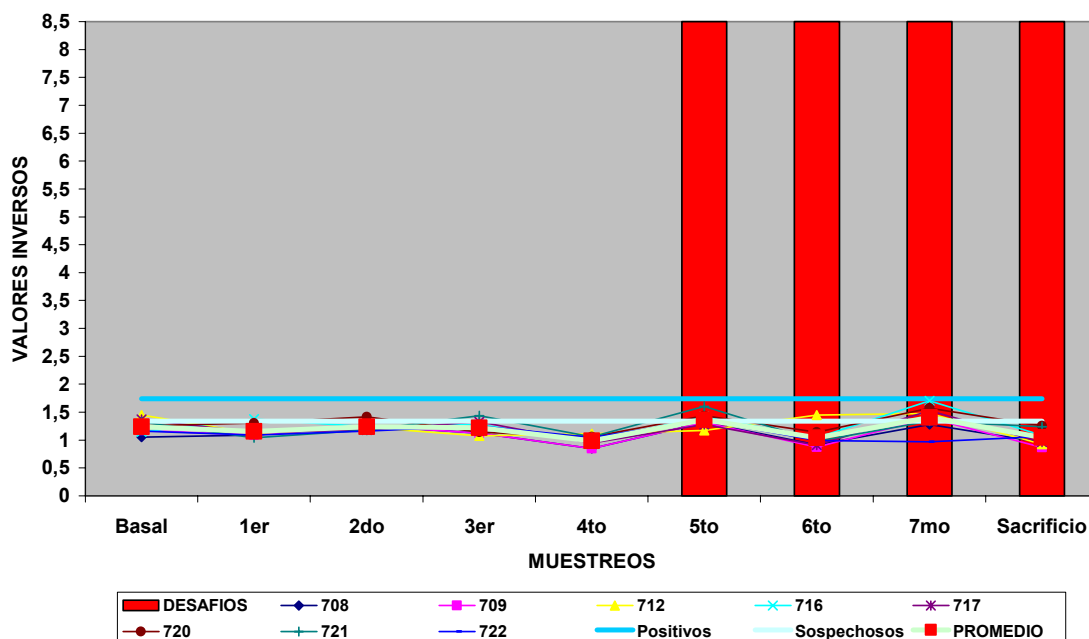
GRUPO C VACUNA CONTRA Mh N.º. De Lechón 707, 713, 714, 719.

GRUPO D RS-100 + VACUNA Mh N.º. de Lechón 710, 711, 715, 718.

En la gráfica 3 se muestra que los lechones de los grupos A y B no desarrollaron anticuerpos; sin embargo se puede observar que el lechón 721 (Gpo.A) en el 3er. muestreo (día 21) fue sospechoso, dejando de serlo para el 4to. muestreo (día 28) donde también se desafió; para el 5to. muestreo (día 35) se observó una ligera elevación en la lectura de anticuerpos sin llegar a ser positivo, disminuyendo para el 6to. muestreo (día 42) se elevó para el 7mo. muestreo (día 49) sin llegar a ser positivo y posteriormente declinar hasta el sacrificio; un comportamiento similar tuvo el lechón 716 (Gpo. B) sin embargo éste aumento en la lectura de anticuerpos se observa hasta el 7mo. muestreo (día 49) sin llegar a ser positivo y declinando posteriormente hasta el sacrificio (ver gráfica No. 3).

Gráfica No. 3 Denota que los Grupos A y B (Control y tratados con RS-100), sin vacunar, no muestran anticuerpos a Mh.

### ELISA *Mycoplasma hyopneumoniae* NO VACUNADOS (Grupos Control y RS-100)



GRUPO A CONTROL NEGATIVO/ POSITIVO N.º. de LECHÓN 717, 720, 721, 722

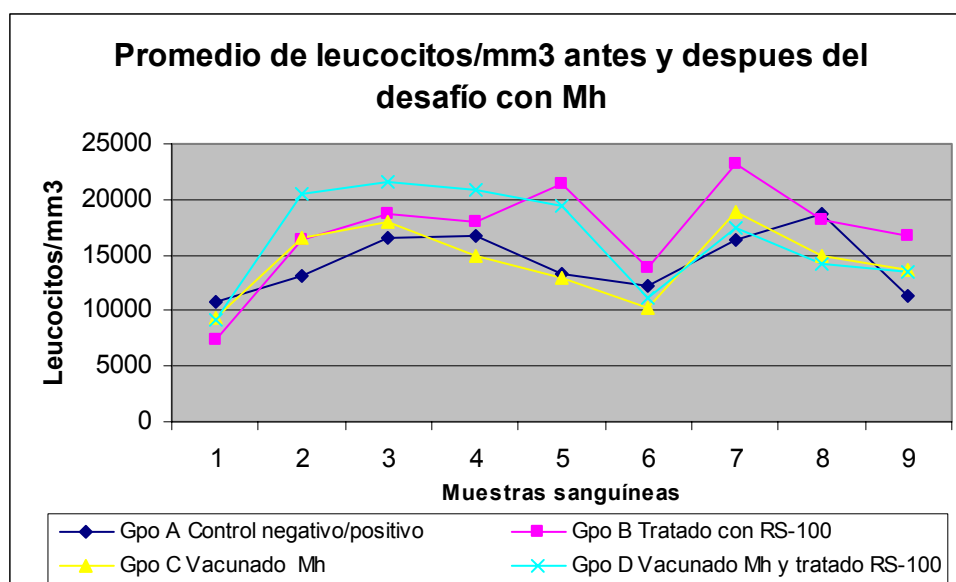
### **4.3. Evaluación del perfil total y diferencial de células blancas**

#### **4.3.1. Cuenta leucocitaria promedio**

Dentro de la cuenta leucocitaria antes y después del desafío los resultados que se obtuvieron en el sangrado basal el promedio mínimo fue para el grupo B (tratado sólo con RS-100) con 7,450 leucocitos/mm<sup>3</sup>, en tanto que el promedio máximo de leucocitos fue para el grupo A (control negativo antes del desafío) con 10,812.5 leucocitos/mm<sup>3</sup>; para el segundo muestreo el grupo B y C (vacunado contra Mh) aumentaron el promedio de leucocitos a 16,562 leucocitos/mm<sup>3</sup> y el grupo D (vacunado más RS-100) aumento considerablemente de 9,100 a 20,537 leucocitos/mm<sup>3</sup> y manteniéndose en forma constante hasta el quinto muestreo que corresponde al desafío con Mh, en tanto que el grupo C aumento ligeramente para el segundo y tercer muestreo a 17,450 leucocitos/mm<sup>3</sup> y para el quinto muestreo bajo a 13,012 leucocitos/mm<sup>3</sup> al momento del desafío (día 28) con Mh, similar al grupo A control negativo/positivo.

Después del desafío día 35 correspondiente al sexto muestreo todos los grupos disminuyeron drásticamente su cantidad promedio de leucocitos siendo el más bajo el grupo C vacunado contra Mh con 10,250 leucocitos/mm<sup>3</sup> y el grupo más alto fue el B tratado sólo con RS-100 con 13,800 leucocitos/mm<sup>3</sup>; para el séptimo muestreo todos los grupos aumentaron la cantidad promedio de leucocitos siendo el más bajo el grupo A con 16,375 leucocitos/mm<sup>3</sup>, seguido de los grupos D y C con 17,412 y 18,875 leucocitos/mm<sup>3</sup> respectivamente, y la cantidad más alta de leucocitos 23,200 leucocitos/mm<sup>3</sup> correspondió a el grupo B tratado sólo con RS-100 (ver gráfica No. 4).

Gráfica No. 4 Promedio de leucocitos/mm<sup>3</sup> antes y después del desafío con *Mycoplasma hyopneumoniae*.



#### 4.3.2. Cuenta de linfocitos

En el perfil diferencial los resultados obtenidos en el promedio inicial de linfocitos para el grupo A control negativo/positivo fue de 6,909 linfocitos/mm<sup>3</sup> aumentando paulatinamente en el segundo y tercero muestreo, para llegar a 12,204 linfocitos/mm<sup>3</sup> en el cuarto muestreo, disminuyendo durante el quinto y sexto muestreo, aumentando ligeramente en el séptimo y octavo muestreo, llegando a 11,409 linfocitos/mm<sup>3</sup> y disminuyendo finalmente a 7,210 linfocitos/mm<sup>3</sup>.

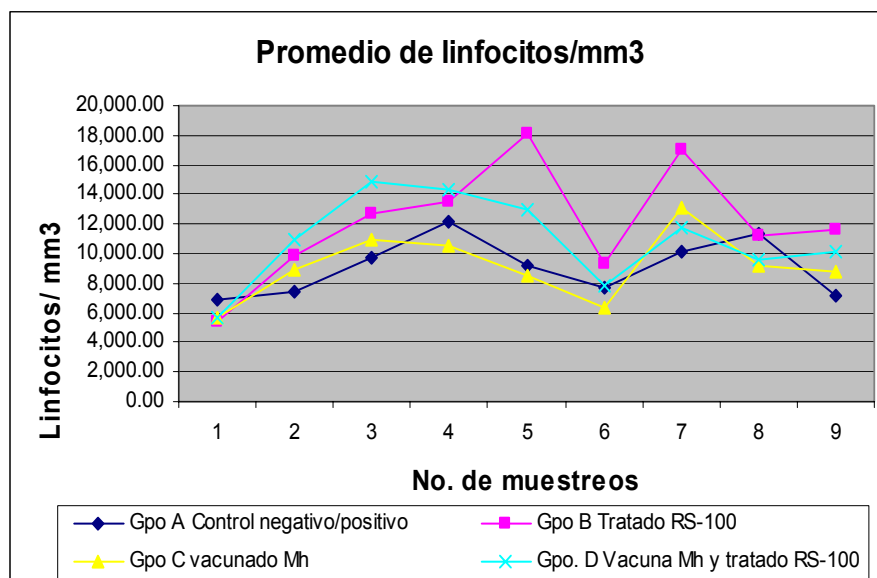
En cuanto al grupo B tratado sólo con RS-100 el promedio inicial de linfocitos/mm<sup>3</sup> fue de 5,421 aumentando sucesivamente durante el segundo, tercero, cuarto y quinto muestreo donde se obtuvo el mayor promedio siendo de 18,103 linfocitos/mm<sup>3</sup>, disminuyendo en el



sexto muestreo, y nuevamente aumenta para el septimo muestreo a 16,976 linfocitos/mm<sup>3</sup>, disminuyendo en el octavo muestreo a 11,592 linfocitos/mm<sup>3</sup> hasta finalizar el experimento. Respecto al grupo C vacunado contra Mh el promedio inicial de linfocitos fue de 5,719/mm<sup>3</sup> aumentando en el segundo, y tercer muestreo llegando a 10,937 linfocitos/mm<sup>3</sup> y disminuyendo en el cuarto, quinto y sexto muestreo hasta 6,291 linfocitos/mm<sup>3</sup> y para el septimo muestreo aumentando a 13,080 linfocitos/mm<sup>3</sup> y disminuyendo así hasta el final del experimento a 8,841 linfocitos/mm<sup>3</sup>.

Los resultados del grupo D vacunado y tratado con RS-100 fueron inicialmente de 5,724 linfocitos/mm<sup>3</sup> aumentando al doble para el segundo muestreo a 10,987 linfocitos/mm<sup>3</sup> y en el tercer muestreo a 14,924 linfocitos/mm<sup>3</sup>, disminuyendo ligeramente en el cuarto muestreo a 14,385 linfocitos/mm<sup>3</sup>, en el quinto muestreo a 12,952 linfocitos/mm<sup>3</sup> y disminuyendo a 7,786 linfocitos/mm<sup>3</sup> en el sexto muestreo y teniendo una alza de 11,805 linfocitos/mm<sup>3</sup> para el septimo muestreo, sin embargo se finalizo el experimento con 10,100 linfocitos/mm<sup>3</sup> (ver gráfica No. 5).

Gráfica No. 5 Promedio de linfocitos de los grupos A, B, C y D respectivamente



#### 4.3.3. Cuenta de neutrófilos

Los resultados promedio de neutrófilos/mm<sup>3</sup> en el grupo A control negativo (día 0 a 28)/ positivo (día 28 a 52) fueron de 3,374 neutrófilos/mm<sup>3</sup> aumentando ligeramente en el segundo y tercer muestreo en 5,116 y 6,325 neutrófilos/mm<sup>3</sup> respectivamente y

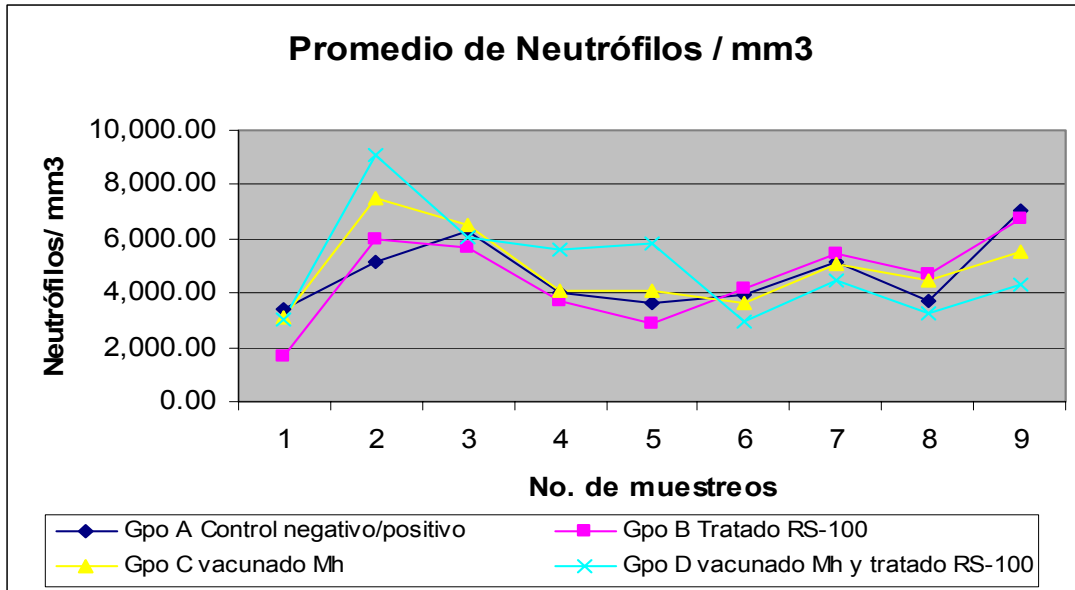
disminuyendo aproximadamente a promedios iniciales durante el cuarto, quinto y sexto muestreo, mientras que para el séptimo muestreo hubo un alza a 5,159 neutrófilos/mm<sup>3</sup>, llegando hasta el final con 7,016 neutrófilos/mm<sup>3</sup>.

En el grupo B tratado sólo con RS-100 su promedio inicial fue de 1,662 neutrófilos/mm<sup>3</sup> aumentando a 5,958 y 5,645 neutrófilos/mm<sup>3</sup> respectivamente para el segundo y tercer muestreo, sin embargo disminuyó a 2,871 neutrófilos/mm<sup>3</sup> para el quinto muestreo, obteniendo una alza paulatina en la curva de 5,430 neutrófilos/mm<sup>3</sup> en el séptimo muestreo, disminuyendo en el octavo muestreo nuevamente a 4,698 neutrófilos/mm<sup>3</sup> para finalizar el experimento en 6,724 neutrófilos/mm<sup>3</sup>.

Para el grupo C vacunado contra Mh, su promedio inicial fue de 3,105 neutrófilos/mm<sup>3</sup> aumentando a más del doble en el segundo muestreo a 7,497 neutrófilos/mm<sup>3</sup>, disminuyendo paulatinamente durante el tercero, cuarto, quinto y sexto muestreo obteniendo 3,665 neutrófilos/mm<sup>3</sup>, aumentando a 5,041 neutrófilos/mm<sup>3</sup> en el séptimo muestreo, disminuyendo ligeramente en el octavo muestreo y finalmente obteniendo 5,524 neutrófilos/mm<sup>3</sup>.

En lo que respecta a el grupo D vacunado y tratado con RS-100, el promedio inicial fue de 3,028 neutrófilos/mm<sup>3</sup>, mostrando el pico más alto para el segundo muestreo con 9,054 neutrófilos/mm<sup>3</sup>; disminuyendo considerablemente para el tercero, cuarto, quinto y sexto muestreo hasta 2,932 neutrófilos/mm<sup>3</sup>, aumentando ligeramente para el séptimo muestreo a 4,440 neutrófilos/mm<sup>3</sup>, nuevamente disminuyendo para el octavo muestreo a 3,243 neutrófilos/mm<sup>3</sup> y finalmente quedando en 4,336 neutrófilos/mm<sup>3</sup> (ver gráfica No. 6).

Gráfica No. 6 Muestra el promedio de neutrófilos en los grupos A, B, C y D del experimento.



#### 4.3.4. Cuenta de monocitos

Los resultados obtenidos con respecto a los monocitos/mm<sup>3</sup> en el Grupo A control negativo/positivo inicialmente fueron de 501 monocitos/mm<sup>3</sup>, disminuyendo en el segundo y tercer muestreo, subiendo nuevamente el cuarto muestreo a 413 monocitos/mm<sup>3</sup>, bajando para el quinto y sexto muestreo, aumentando a 482 monocitos/mm<sup>3</sup>, para finalizar el experimento en 205 monocitos/mm<sup>3</sup>.

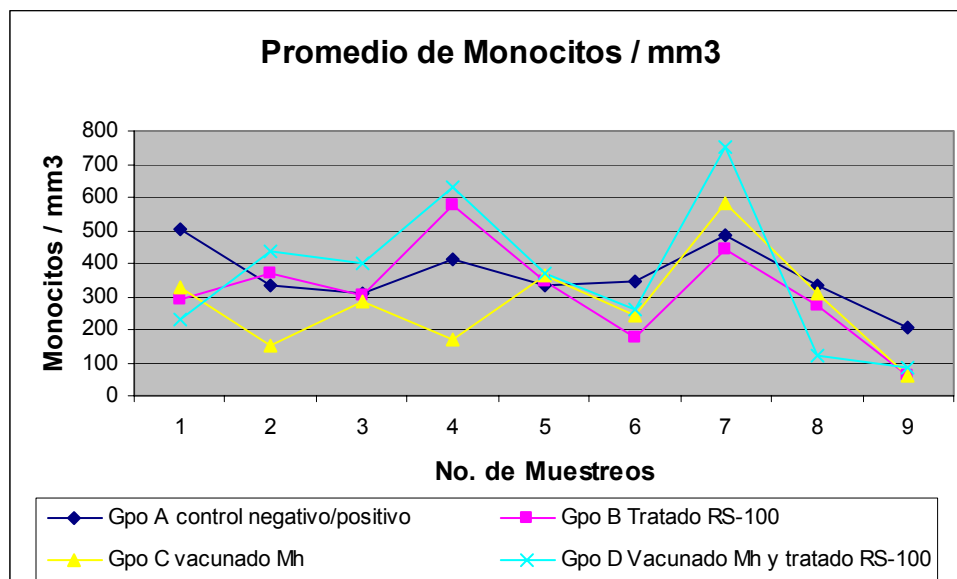
En el grupo B tratado sólo con RS-100, inicialmente se registraron 290 monocitos/mm<sup>3</sup> aumentando paulatinamente hasta el cuarto muestreo a 578 monocitos/mm<sup>3</sup>, disminuyendo para el quinto y sexto muestreo, aumentando a 443 monocitos/mm<sup>3</sup> para el séptimo muestreo y disminuyendo a 62 monocitos/mm<sup>3</sup> al finalizar el experimento.

Para el grupo C vacunado contra Mh, el promedio inicial fue de 326 monocitos/mm<sup>3</sup>, mostrando los picos más altos en los muestreos tercero, quinto y séptimo con 283, 364 y 579 monocitos/mm<sup>3</sup> respectivamente, sin embargo al finalizar el experimento concluyó en 62 monocitos/mm<sup>3</sup>.

En cuanto al grupo D vacunado y tratado sólo con RS-100, inicialmente obtuvo 231 monocitos/mm<sup>3</sup> aumentando así hasta el cuarto muestreo donde hubo 630 monocitos/mm<sup>3</sup>, disminuyendo durante el quinto a 370 monocitos/mm<sup>3</sup> y sexto muestreo a 258 monocitos/mm<sup>3</sup> respectivamente, aumentando en el séptimo muestreo a 754

monocitos/mm<sup>3</sup> y disminuyendo hasta finalizar el experimento en 84 monocitos/mm<sup>3</sup> (ver gráfica No. 7).

Gráfica No. 7 Muestra el promedio de monocitos de los grupos experimentales A, B, C y D.



#### 4.4. Evaluación de lesiones macroscópicas

En los resultados obtenidos en el porcentaje de lesión pulmonar en el Grupo A (control negativo/positivo), el lechón que obtuvo el menor porcentaje de lesión fue el No. 720 con 3.2 % y el de mayor porcentaje de lesión pulmonar fue el No. 721 con el 10.0 % de lesión pulmonar. En cuanto al porcentaje de lesión pulmonar de este grupo fue de 5.6 %, lo cual pone de manifiesto la presencia de *M. hyopneumoniae* en el grupo no tratado (observar en anexos Figs. No. 13 a 16).

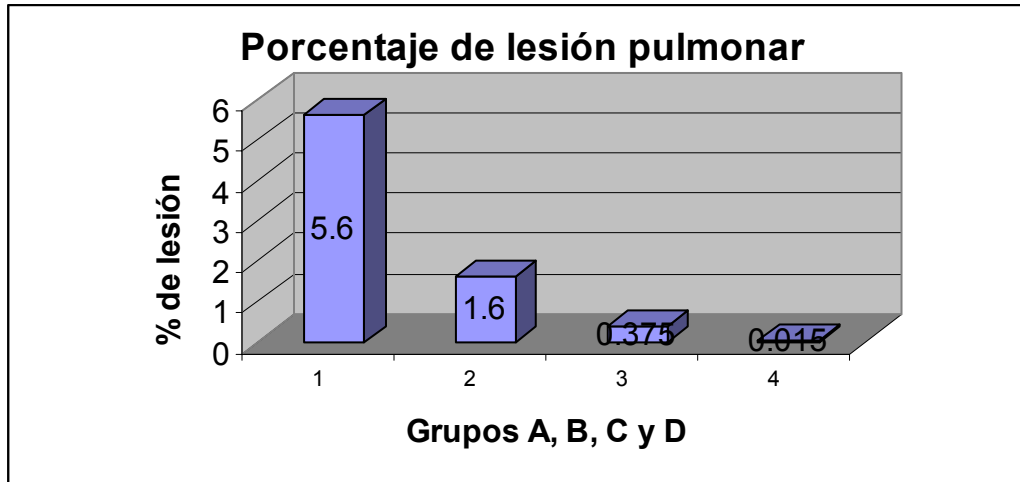
En cuanto a los resultados de el Grupo B tratado sólo con RS-100 sólo dos lechones obtuvieron lesión pulmonar, el lechón No. 716 con 2.2 % de lesión pulmonar y el lechón

No. 709 con un porcentaje de 4.2 % de lesión pulmonar; mientras que los otros lechones que integran el grupo no presentaron cambios patológicos aparentes en cuanto al porcentaje de lesión pulmonar. El porcentaje obtenido de lesión pulmonar para este grupo fue de 1.6% (observar en anexos Figs. No. 9 a 12).

En lo que respecta al Grupo C vacunado contra *M. hyopneumoniae* el porcentaje más bajo fue para el lechón No. 714 con 0.6% de lesión pulmonar, mientras que el lechón No. 713 obtuvo el mayor porcentaje de lesión pulmonar siendo este de 0.9 %; para los demás integrantes del grupo el resultado fue de 0 % de lesión. Con respecto al porcentaje de lesión pulmonar obtenido fue de 0.375 % para dicho grupo (observar en anexos Figs. No. 5 a 8).

Para el Grupo D vacunado y tratado sólo con RS-100 los resultados obtenidos fueron los siguientes, el menor porcentaje de lesión pulmonar fue obtenido por el lechón No. 711 con 0.01 % de lesión y el mayor porcentaje fue para el lechón No. 718 con 0.05 % y los lechones No.710 y 715 no tuvieron cambios patológicos en cuanto a lesión pulmonar. El porcentaje de lesión pulmonar para este grupo fue de 0.015% (observar en anexos Figs. No 1 a 4); porcentaje de lesión pulmonar de los grupos experimentales (ver gráfica No.9).

Gráfica No. 9 Porcentaje de lesión pulmonar de los grupos experimentales



#### 4.5. Identificación del agente etiológico mediante aislamiento

Con la finalidad de identificar al agente etiológico *M. hyopneumoniae* se procedió a coleccionar muestras de tejido pulmonar al momento de la necropsia en forma aséptica del grupo A control positivo, depositándose en bolsas de plástico en un termo de refrigeración y fueron transportados al laboratorio de Microbiología de la FES.- Cuautitlán, para sembrar una muestra de bronquios en tubos con medio líquido de Friis, e incubarlas a 37 °C, observando diariamente hasta su cambio de coloración y posteriormente resembrar en medio sólido de Friis, e incubar a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>, observando hasta que presentaran cambio de color y finalmente identificar las colonias de *M. hyopneumoniae* al microscopio estereoscópico, confirmando la presencia del *Mycoplasma* obteniendo un resultado positivo y se confirmó por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), (ver cuadro 2).

Confirmación de cultivos con *Mycoplasma hyopneumoniae*  
 por Reacción en Cadena de la Polimerasa

| No. Caso    | IDENTIFICACIÓN                         | Dx              |
|-------------|--|-----------------|
|             |  | <i>M. hyop.</i> |
| DCV-06-2814 | 1. Cultivo 1: SJ-01, SF (Jun 14, 2006) | Positivo        |
|             | 2. Cultivo 2: SJ-01, CF (Jun 14, 2006) | Positivo        |
|             | 3. Cultivo 3: SJ-03, CF (Jun 14, 2006) | Negativo        |
|             | 4. Cultivo 4: SJ-05, CF (Jun 14, 2006) | Positivo        |
|             | 5. Cultivo 5: SJ-06, SF (Jun 14, 2006) | Positivo        |
|             | 6. Cultivo 6: SJ-06, CF (Jun 14, 2006) | Positivo        |
|             | 7. Cultivo 7: SJ-07, CF (Jun 14, 2006) | Positivo        |
|             | 8. Cultivo 8: SJ-08, SF (Jun 14, 2006) | Positivo        |

#### 4.6. Evaluación de ganancia diaria de peso (GDP)

Durante el experimento se peso a los lechones cada 5 días para evaluar la GDP en los grupos experimentales, observandose que inicialmente fue el grupo B tratado sólo con RS-100 el que obtuvo un mayor peso promedio de 14.4g, y el que obtuvo el menor peso promedio fue el grupo C con 11.55 g, comparado con el grupo A control que obtuvo 11.95 g, durante el proceso de los pesajes se observo que los grupos B y D fueron los que obtuvieron el peso promedio más alto de 20.025g y 19.450g respectivamente, y al obtener sus GDP fueron de 0.225g y 0.246g comparados con el grupo A control que obtuvo una GDP de 0.177 g (ver gráfica No.8).

Gráfica No. 8 Muestra la Ganancia Diaria de Peso en los Grupos A, B, C y D del experimento.

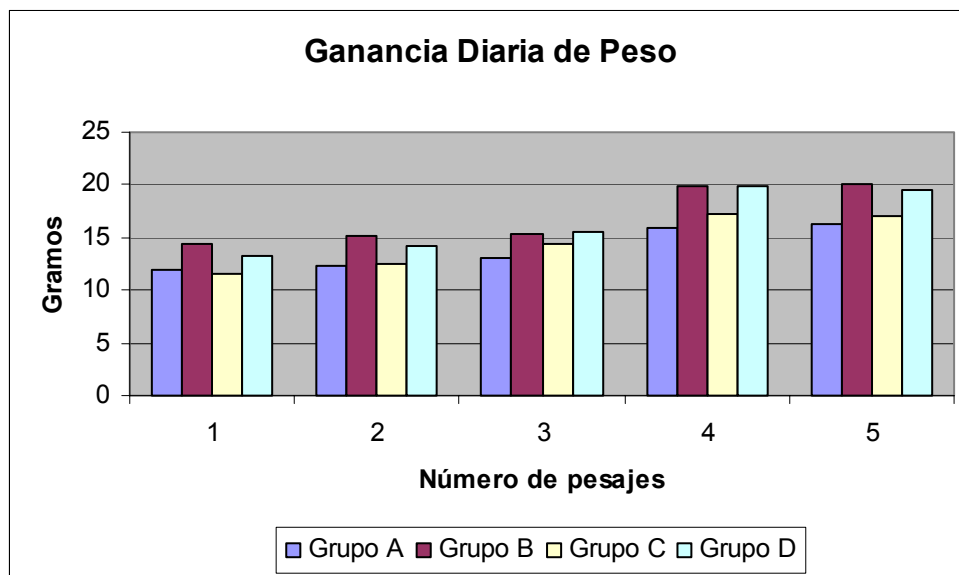


Tabla B de pesos promedio de los grupos A, B, C, y D del estudio de RS-100 y *Mycoplasma hyopneumoniae*.

| Grupos     | A     | B    | C     | D      |
|------------|-------|------|-------|--------|
| 1er.Pesaje | 11.95 | 14.4 | 11.55 | 13.3   |
| 2do.Pesaje | 12.25 | 15.1 | 12.5  | 14.225 |



|             |        |        |        |        |
|-------------|--------|--------|--------|--------|
| 3er. Pesaje | 13.125 | 15.35  | 14.3   | 15.625 |
| 4to. Pesaje | 15.975 | 19.975 | 17.2   | 19.9   |
| 5to. Pesaje | 16.375 | 20.025 | 17.125 | 19.45  |

## 5. DISCUSIÓN

Los problemas respiratorios en la porcicultura son la causa más importante de pérdidas económicas para el porcicultor, ya sea como decomiso en rastros o por una deficiente conversión alimenticia y ganancia diaria de peso (Lara, 2005).

En el desarrollo de este experimento al realizar la evaluación clínica de la temperatura se pudo observar que todos los grupos se mantuvieron en una temperatura promedio de 39.2 °C y sólo se aumento hasta 40.4 °C en promedio después del primer desafío, comportandose de igual manera en los siguientes desafíos, lo cual confirmo que el patógeno estaba iniciando los problemas respiratorios en los lechones, algo similar ocurrió en un estudio donde se indujo la neumonia con *M. hyopneumoniae*, en grupos vacunados y no vacunados contra micoplasmosis, realizado por un grupo de investigadores del Instituto de Investigación en Medicina Veterinaria de la Universidad del Estado de Iowa, (Thacker y col., 2000).

La vacunación es reconocida como una de las herramientas veterinarias más efectivas para el control y prevención de las enfermedades infecciosas en los cerdos (Friendship y Prescott., 2006), sin embargo la presencia de anticuerpos producto de la vacunación no siempre garantiza la protección contra la enfermedad (Utrera, 2007).

Con respecto a la evaluación serológica por ELISA competitiva se observo que sólo los grupos vacunados fueron positivos a anticuerpos, lo que demostró que se garantizo un nivel adecuado de anticuerpos y que además en el grupo D vacunado más tratado con RS-100 la curva de anticuerpos fue aún mayor, con respecto a el otro grupo vacunado, debido a que el RS-100 tuvo un efecto modulador incrementando el nivel de anticuerpos detectado por ELISA competitiva, resultados similares muestra la investigación realizada por Stipkovits y col., 2002, donde mencionan resultados significativos trabajando con cuatro grupos de 25 cerdos cada uno, y el nivel de anticuerpos detectados por ELISA de bloqueo aumento significativamente al aplicar un producto llamado Inmodulen, suspensión inyectable inmunomoduladora a base de LPS (lipopolisacarido) sustancia que modula el status inmunitario del ganado porcino (Stipkovits y col., 2002)

En este proyecto de investigación al evaluar el perfil total y diferencial de células blancas los resultados que se obtuvieron demuestran que no hubo diferencia estadística significativa ( $P > 0.05$ ) entre grupos, pero se observaron cambios en la cuenta total y diferencial entre tratamientos de los grupos y en términos generales los grupos se mantuvieron dentro de los parámetros normales (11,000 a 22,000 células/mm<sup>3</sup>), inicialmente el promedio de los leucocitos del grupo A que fue tomado como control negativo del día 0 a el día 28 tuvo un promedio de 10,812 leucocitos/mm<sup>3</sup> y se mantuvo dentro de los parámetros normales una vez que fueron desafiados al día 28 siendo de 13,228 leucocitos/mm<sup>3</sup>, manteniendo estos niveles normales hasta el término del experimento en 11,362 leucocitos/mm<sup>3</sup>.

En el grupo B tratado sólo con RS-100 en el primer muestreo se tuvo un promedio de 7,450 leucocitos/mm<sup>3</sup>, aumentando así progresivamente hasta el quinto muestreo a 21,425 leucocitos/mm<sup>3</sup> cayendo los niveles después del primer desafío, obteniendo su mayor porcentaje para el séptimo muestreo siendo de 23,200 leucocitos/mm<sup>3</sup>, disminuyendo un poco hasta finalizar el experimento obteniendo 16,662 leucocitos/mm<sup>3</sup> manteniéndose dentro de los niveles normales.

En cuanto al grupo C vacunado contra Mh, inicialmente se obtuvo un promedio de 9,100 leucocitos/mm<sup>3</sup>, aumentando para el segundo y tercer muestreo a 17,950 leucocitos/mm<sup>3</sup> y disminuyendo drásticamente durante el cuarto, quinto y sexto muestreo obteniendo 10,250 leucocitos/mm<sup>3</sup> y aumentando a 18,875 leucocitos/mm<sup>3</sup> para el séptimo muestreo; sin embargo nuevamente disminuyó el promedio hasta el sacrificio mostrando 13,637 leucocitos/mm<sup>3</sup> manteniéndose en niveles normales.

El grupo D tratado con RS-100 y vacuna contra Mh en el primer muestreo mostró 9,100 leucocitos/mm<sup>3</sup>, posteriormente el promedio de leucocitos aumentó para el segundo y tercer muestreo a 21,600 leucocitos/mm<sup>3</sup> manteniéndose y para el sexto muestreo disminuyó a 11,175 leucocitos/mm<sup>3</sup>, en el séptimo muestreo aumentó a 17,412 leucocitos/mm<sup>3</sup> disminuyendo para el octavo muestreo y hasta el final del experimento obteniendo 13,462 leucocitos/mm<sup>3</sup> manteniendo niveles normales.

Como se puede observar los resultados de este experimento demostraron que los niveles promedio de leucocitos/mm<sup>3</sup> se mantuvieron dentro del rango normal donde los grupos B y D presentaron los niveles más altos, que fueron aquellos lechones a los que se les trató con RS-100, esto demostró el estímulo inmunológico que ejerció el inmunomodulador sobre las células blancas, Vázquez y Col., (2002) realizaron un estudio donde se midieron los efectos de *Saccharomyces cerevisiae* 47 (SC47) con

propiedades inmunoestimulantes administrado por vía oral en cerdos infectados con *E. coli*, obteniendo resultados similares en cuanto a la población promedio de glóbulos blancos.

En el conteo diferencial se observó que el promedio de linfocitos en los grupos B y D obtuvieron una ligera linfopenia, para el grupo B fue de 18,103 y 16,976 linfocitos/mm<sup>3</sup> en los muestreos quinto y sexto, en tanto que el grupo D mostró 14,924 y 14,385 linfocitos/mm<sup>3</sup> en el tercer y cuarto muestreo, comparados con los grupos A y C que mantuvieron sus niveles normales de 5,719 a 8,841 linfocitos/mm<sup>3</sup> respectivamente.

Esto indico que los grupos tratados con RS-100 respondieron activamente para el tipo de inflamación y consecuente con los desafíos, favoreciendo la estimulación celular en contra del *Mycoplasma*. En el estudio realizado por Vázquez y col., encontraron un aumento en los valores de linfocitos en los grupos donde se trato con un inmunoestimulante llamado *Saccharomyces cerevisiae* 47 (SC47) en lechones de 30 días infectados con *E.coli*.

En el conteo de neutrófilos el grupo B tratado sólo con RS-100 al inicio y para el quinto muestreo postdesafío mostró una neutropenia obteniendo 1,662 neutrófilos/mm<sup>3</sup> y 2,871 neutrófilos/mm<sup>3</sup> respectivamente, finalizando dentro de los parámetros normales; en el grupo D vacunado contra Mh y tratado con RS-100, al inicio y sexto muestreo fue algo similar donde se obtuvo 3,028 neutrófilos/mm<sup>3</sup> y 2,932 neutrófilos/mm<sup>3</sup> respectivamente, obteniendo valores normales al término del experimento, comparados con los grupos A y C que mantuvieron sus niveles normales con rangos de 3,105 a 7,497 neutrófilos/mm<sup>3</sup> durante todo el experimento.

En una investigación realizada con el inmunomodulador RS-100 en equinos afectados con Dermatitis micótica crónica reportan que se incrementó una respuesta inmunológica en cuanto a linfocitos, pero así mismo se presenta una neutropenia significativa al inicio del tratamiento con RS-100, lo cual demostró que éste tiene la capacidad de modular la respuesta inmune (Miranda y col., 2005).

En cuanto al porcentaje de lesión pulmonar los resultados indicaron que el grupo A control negativo/positivo obtuvo el mayor porcentaje de lesión pulmonar 5.6 % comparado con los grupos que se les administró RS-100 y vacuna de *M. hyopneumoniae* donde se obtuvieron mínimos porcentajes de lesión en un rango de 1.6 a 0.015 % de lesión pulmonar. En un estudio realizado por Cruz y col., (2003) al evaluar la cinética de la infección experimental en cerdos infectados con *Mycoplasma hyopneumoniae*

obtuvieron un porcentaje promedio de lesiones macroscópicas medidas por planimetría de 2.4 a 17.2 %; en otro estudio realizado por Roongroje y col.,(2004) donde midió el incremento de la producción de citocinas proinflamatorias siguiendo la infección con el VPRRS y *M. hyopneumoniae*, reporta porcentajes de lesión pulmonar de 8 a 12 % en lechones desafiados con *M. hyopneumoniae*. Las diferencias encontradas en relación a la presencia de las lesiones están correlacionadas con la reducción del aislamiento del *M. hyopneumoniae* y confirmandose de nuevo el efecto del inmunomodulador RS-100, restaurando de este modo la capacidad de respuesta de los neutrófilos, linfocitos y anticuerpos del cerdo y frenando la capacidad patógena del *M. hyopneumoniae* y por lo tanto su multiplicación.

De los datos observados en la ganancia diaria de peso obtenida en los grupos de cerdos tratados con RS-100 y vacuna más RS-100, se pudo determinar que también el inmunomodulador coopero para una mayor ganancia de peso para estos grupos, comparados con los grupos que no fueron tratados con RS-100, esto debido a que no se presento mayor grado de lesión neumónica, lo cual no quiere decir que el RS-100 sea un promotor de crecimiento en forma directa, tampoco es un anabólico o clenbuterol, sino porque coadyuvo en la respuesta inmune de los lechones permitiendo mejores condiciones; Erazo y col.,(2002) al hacer una evaluación zootécnica y sanitaria de la administración de un inmunoterapéutico llamado inmodulen en lechones neonatos, encontró una ganancia de peso para el grupo tratado de 0.234 g comparado con el control o grupo no tratado de 0.126 g, dado por la capacidad estimulante del sistema inmune de los inmunomoduladores.

Por lo tanto si se cumplió con la hipótesis propuesta ya que el inmunomodulador coadyuvo aumentando la función leucocitaria favoreciendo la respuesta inmune de los lechones lo que se reflejo en la disminución del porcentaje de lesión pulmonar. Esto permitió que se cumplierán los objetivos trazados en esta investigación y por lo tanto creo que al reducir el porcentaje de lesión neumónica y obtener ganancias de peso aunque no sean tan significativas esto ayudaría a la porcicultura debido a que las pérdidas económicas son consecuencia de la mala conversión alimenticia y baja ganancia de peso, sin embargo esto se podría mejorar si se realizara una investigación del costo – beneficio del inmunomodulador RS-100 para no elevar los costos de producción de la porcicultura en nuestro país.

## 6. CONCLUSIONES

Se concluye que en el grupo (C) de los lechones vacunados con *M. hyopneumoniae* se obtuvo un aumento en la curva de anticuerpos mediante la técnica de ELISA, pero el grupo (D) de lechones tratados con RS-100 y vacunados contra *M. hyopneumoniae* aumentaron considerablemente el título de anticuerpos medidos mediante la técnica de ELISA, siendo estos resultados estadísticamente significativos.

En cuanto a la evaluación del perfil total y diferencial de células blancas el grupo que predominó hasta antes del desafío fue el grupo D y posteriormente al desafío el grupo que permaneció con niveles altos de leucocitos fue el grupo B, lo que demostró que hay sinergia entre el RS-100 y la vacunación, mientras que para el grupo B el RS-100 moduló la respuesta de los leucocitos en los lechones.

En el análisis de gráficas de leucocitos totales de el grupo tratado con RS-100 y el grupo vacunado contra *M. hyopneumoniae* más RS-100 se observó que hubo un aumento en las curvas indicando mayor cantidad de leucocitos que los grupos donde no recibieron RS-100.

En conclusión, en base al análisis de varianza y t de Student se puede afirmar que el inmunomodulador RS-100 constituye una alternativa inmunológica para el control de los casos clínicos agudos o crónicos por infecciones inmunosupresoras, y además confiere una reducción en la carga bacteriana que se refleja en los cuadros clínicos ocasionados por el *Mycoplasma*.

## 7. LITERATURA CITADA

Andrade, M.; Fernández, A.; Del Pozo, M. y Sánchez – Vizcaíno, J. M. (2003). Neumonía Enzoótica. Universidad Complutense de Madrid. Editorial JM. Sánchez - Vizcaino. Madrid, España.

Andrade, M.; Fernández, A.; Del Pozo, M. y Sánchez – Vizcaíno, J. M. (2005). Curso digital de enfermedades infecciosas porcinas. Editorial JM. Sánchez- Vizcaino. Madrid, España.

Andrada, M.; Espinosa, A.; Rodríguez, F.; Herráez, P.; Fernández, A.(2003). Estrategias de intervención y costo de la neumonía enzoótica porcina. Porci, 74: 89-103.

Calsamiglia, M.; Pijoan, C.; Trigo, A. (2003). Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. J. Vet Diagnos Invest, 11:246-251.

Ciprián, C. J. A. (1978). Tesis Maestría: Aislamiento y caracterización de Micoplasmas a partir de pulmones neumónicos de ovinos y caprinos en México. FES-Cuautitlán, UNAM. México.

Ciprián, C. J. A. (1987). Tesis Doctor: "Interacción entre *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Pasteurella multocida* en las neumonías de los cerdos". FES-Cuautitlán, UNAM. México.

Ciprián, C; Mendoza, E. y Cruz, S. (2001). Neumonía enzoótica: Etiología, Inmunidad y diagnóstico de *Micoplasma hyopneumoniae*. En: Memorias del Tercer Ciclo Nacional de Enfermedades Respiratorias del Cerdo. FES- Cuautitlán, UNAM. México.

Cruz, S. y Ciprián, C. (2004). Manual de laboratorio para el diagnóstico de la neumonía enzoótica. Editorial UNAM. FES-C. México.

Cruz, S.; Tórtora, P.; Vega, M.; Romero, A.; Mendoza, S.; García, S.; Resendíz, M.; Ciprián, A. (2003). Cinética de la infección experimental en cerdos con *Mycoplasma hyopneumoniae* utilizando inmunofluorescencia. Revista Veterinaria México. 34 (1).

Díaz, E. E., (1999). *Mycoplasma hyopneumoniae*. Asesor Técnico Unidad de negocios porcinos. Publicación del Departamento Técnico de Boehringer, México.

Epperson, B. (2002). El valor del sistema todo dentro todo fuera y destete temprano. En: Acontecer porcino. Vol. X, No. 55.

Erazo, G. P.; Marca, J.; Navarrete, E. (2002). Evaluación zootécnica y sanitaria de la administración del inmunoterapéutico Inmodulen en Madres gestantes y lechones neonatos. Investigación Aplicada a la Salud Animal. Ecuador. Laboratorios Calier, S. A. Publicado Laboratorios Calier.

España, E.; Riera, P.; Artigas, C.; Ferrés, J.; Alemany, R. (1994). Activity of an adjuvant based on Levamisole, used as a diluent of a live freeze-dried vaccine against Aujeszky's disease. *Med. Vet.* 11 ( 6).

Euzeby, J. P. Propriétés immunostimulantes du lévamisole. (1986). Applications en médecine vétérinaire et effets secondaires. *Revue Méd. Vét.* 137 (7):499-520.

Fano,E; (2007). En: Epidemiología e inmunidad de hato del PRDC (*Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuroneumoniae* e Influenza porcina). En: Memorias del XLII Congreso Nacional de AMVEC, A.C., Querétaro, Qro. México.

Ferro, A.; Marca, J.; Navarrete, E.; Stipkovits, L.; (2007). Evaluación del inmunoterapéutico inmodulen en lechones neonatos. [www.calier.españa](http://www.calier.españa)

Friendship y Prescott. (2006). En vacunología en la medicina de porcinos. En Memorias del XLII Congreso Nacional de AMVEC, A.C., Querétaro, Qro. México.

Friis, N. F. (1975). Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis pneumoniae* and *Mycoplasma flocculare*. *Nord. Veterinary en Med.* 27:337-339.

García, R. O., Lobo, M. G. (1989). Enfermedades de los cerdos. Primera edición. Ed. Trillas. México, Méx.

Hirose, F., (2001). *Mycoplasma* – Pneumonia Enzoótica. Publicado por Agrupación de consultores en Tecnologías del cerdo. [www.acontece.com](http://www.acontece.com) Argentina.

Jones, G. F., Rapp – Gabrielson, V. Wilke, R, Thacker, L. E.(2005). Intradermal Vaccinación for *Mycoplasma hyopneumoniae* En: *Journal of Swine Health and production*, Vol. 13, No. 1.

Keith, R.; Erlansdson, B. S.; Thacker, B. J.; Bush, J. E. (2002). *Mycoplasma hyopneumoniae* seroprevalence and control strategies on farms participating in the National Animal Health Monitoring System (NAHMS) swine 2000. En: 33<sup>rd</sup>. Annual Meeting. American Association of Swine Veterinarians. Kansas city. Missouri.

Kobisch, M. y Friis, N. F. (1996). *Mycoplasma hyopneumoniae* infection en pigs: duration of the disease and resistance to reinfection. *Vet. Res.*, 24: 67-77.

Lara, P. J. H. (2005). En: Tesis de maestría “Desarrollo de un modelo experimental para demostrar la interacción existente entre *Haemophilus parasuis* y/o *Mycoplasma hyopneumoniae* y/o *Mycoplasma hyorhinis*”.



Méndoza, E. S; Ciprián, C. A. y Cruz, S. T. (2001). Neumonía enzoótica: Etiología, inmunidad, y diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae*. En Tercer ciclo nacional de enfermedades respiratorias del cerdo. Universidad Autónoma de México, FES–Cuautitlán. México.

Miranda, H. E; Rios, M. A; Cruz, S. T; Salas, M. A; Romero, R. A. (2005). Utilización del Inmunomodulador RS-100 en el tratamiento de dermatitis micótica crónica en un equino. En: Veterinaria México. Vol. 36. Num. 3. UNAM. México.

Montaraz, C. J. A.(1992). Inmunidad en el tracto respiratorio del cerdo. En Avances en Producción Porcina. Vol.1. Editado por Antonio Morilla, Ediciones de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, A. C. México. Mex.

Morilla, G. A. (2005). Manual para el control de las enfermedades infecciosas de los cerdo. 2ª Edición . Editorial El Manual Moderno, México.

Muñoz, A.; Pallares, F.J.; Ramis, G.; Escámez, A.; Berrocal, F. (1995). Neumonía Enzoótica. Inmunoprofilaxis contra la micoplasmosis porcina. Porci, aula veterinaria; tratado de ganado porcino, 27: 51-67.

Pappaterra, M. G. J. (2002). En Tesis Doctor: Efecto in Vitro in vivo de un inmunomodulador compuesto por LPS de *E.coli* y *propionbacterium granulosum* sobre el sistema inmune del cerdo. Universidad Autónoma de Barcelona, España

Pastoret, P. P. (1998). “ Handbook of Vertebrate Immunology”, Editado Academia Press, Great Britain.

Pijoan y Fano, (2007). Epidemiología de *Mycoplasma Hyopneumoniae*. Un punto de vista diferente. En: Rev. Los porcicultores y su entorno. Año 10, No. 56 .

Rapp – Gabrielson,; Gergen, L. M. S; Brad, E.B.S; et al. (2002). Evaluación of duración of immunity alter vacunación of swine with a single dose of *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin (M + Pac ®). En: 33<sup>rd</sup>. Annual Meeting. American Association of Swine Veterinarians. Kansas city. Missouri.

Ramírez, N. R., Pijoan, A. C. (1982). Diagnóstico de las enfermedades del cerdo. Primera Edición. México.

Rodríguez, G. E. (2004). Importancia de *Mycoplasma hyopneumoniae*. En: Mundo ganadero, laboratorios Hipra, S. A. México.

Rojas, E. O., Paredes, A. P. (2003). Fagocitosis: mecanismos y consecuencias. Bioquímica. Vol. 28, No. 4 . 19- 30.

Romero, R. A., Cano, L., Rodríguez, A., Estrada, S. (2001). Perspectivas de la manipulación del sistema inmune (inmunomodulación) en el cerdo. En: Tercer ciclo nacional de enfermedades respiratorias del cerdo. UNAM. FES – Cuautitlán..

Roof, B. M. and Zuckerman, F. (2002). Evaluación de la eficacia y de la respuesta inmune de bacterinas comerciales contra *Mycoplasma hyopneumoniae*. Publicación del Departamento Técnico de Boehringer. Guadalajara, Jal. México.

Roongroje, T., Thacker, B., Albur, P. y Thacker, E. L. (2004). Increased Production of Proinflammatory Cytokines following Infection With Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus and *Mycoplasma Hyopneumoniae*. En: Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. Vol. 11, No. 5.

Roth, J. (2002). Conceptos básicos de la Inmunidad. Collage of Veterinary Medicine . Iowa State University. Editado por Solvay Animal Health . En: Mundo Porcino. Núm. 1.

Sánchez, V. A. (2003). Tesis de grado “Efecto de un inmunoestimulante en cerdos vacunados contra el Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino e inoculados con un virus de referencia”. UNAM. México.

Sánchez-Vizcaíno, J.M. (2004). Course of introduction to the swine immunology. Segunda Edición, España. [WWW.sanidadanimal](http://WWW.sanidadanimal.info).Info

Solleras, M. J. M. (2004). ¿Que sabemos actualmente sobre la infección causada por *Micoplasma hyopneumoniae*?, Publicación Técnica de Boehringer Ingelheim, España 31 – 44.

Suárez, P. y Casas, J. (2001). Vacunación frente a *Mycoplasma*.. [www.exopol.com](http://www.exopol.com). España.

Stipkovits, L., Otvös Imre Marca, J., Tarés, J. (2002).Efecto comparativo de Inmodulen frente a la antibioterapia convencional en la neumonía bacteriana porcina. Veterinary Medical Research Institute of the Hungarian Academy of Sciencies, Budapest, Hungary., Laboratorios CALIER, S. A. Departament I&D, Dunavet, Budapest. Publicaciones CALIER.

Taylor, D. J. (2000). PIG DISEASES. Seventh edition. Escocia, Inglaterra.

Thacker, E. L., Halbur, G. P., Roos, F. R., Roongroje, T., and Thacker, B. J. (1998). *Mycoplasma hyopneumoniae* Potentiation of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus-Induced Pneumoniae. Veterinary Medical Research Institute and Veterinary Diagnostic and Production Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Iowa State University, Ames, Iowa. En: Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. Vol.11 (5), 901 – 912.

Thacker, E. L., Thacker, B. J., Young, T. F., Halbur, G. P. (2000). Effect of vaccination on the potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)- induced pneumonia by *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vaccine 18, 1244- 1252. ELSEVIER.

Thacker, E. L. (2004). Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. College of Veterinary Medicine, Iowa State University, Ames, I.A. En: Animal Health Research Rev. 5(2): 317-20.

Trigo, T. F. J. (1998). Patología sistémica veterinaria. 3ra. Edición. Mc Graw Hill Interamericana. México.

Utrera, T. V. (2007). Vacunología en la medicina de porcinos. En: Memorias del XLII Congreso Nacional de AMVEC,A.C., Querétaro, Qro.México.

Vázquez, Ch. J.C; Cuarón, I. J; Monroy, S. H. G; Pérez, S. L. S; Fajardo, M. R; Zamora, E. J. L; Lagunas, B. S; Alejandrí, C. (2002). Estudio de los efectos de la SC47 proporcionada vía oral sobre el sistema inmunocompetente en cerdos infectados naturalmente con *E.coli*. CIESA-FMVZ-UAEM; Editado: INIFAP-CENID-Fisiología, Querétaro.

Vargas, P. L. E. (2000). Manual de prácticas de laboratorio clínico. Facultad de Agrobiología. Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Tlaxcala. Tlax.

## 8. ANEXOS

### DESCRIPCIÓN DE LAS PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO

#### a) ELISA competitiva.

Esta prueba se utiliza para detectar anticuerpos. Es una prueba rápida y confiable.

#### Interpretación:

Si hay reacción con color el resultado es negativo y sin color el resultado es positivo.

#### Equipo:

1. Estufa bacteriológica a 37 °C con humedad
2. Impresora
3. Lector para placas de ELISA con impresora
4. Micropipetas de 8 – 12 canales con capacidad de 50 – 300 µl
5. Micropipeta de un solo canal de 5 – 100 µl
6. Pipetas de 1, 5, y 10 ml
7. Potenciometro
8. Refrigerador de 9 pies cúbicos con congelador

#### Materiales:

1. Frascos de vidrio de 50, 100 y 500 ml con tapón de rosca
2. Microplacas de plástico de 96 pozos con anticuerpo monoclonal ligado a la superficie, preservados en glicerina
3. Microplacas de plástico con 96 pozos de fondo plano
4. Puntas de plástico para micropipetas de 300 µl de capacidad
5. Recipiente contenedor de soluciones
6. Vaso de precipitado de 500 ml
7. Toallas de papel

Reactivos :

1. Sueros de referencia, 1) Suero positivo fuerte, 2) Suero positivo débil, 3) Suero negativo de referencia o débil y 4) Suero negativo
2. Acetato de Sodio 0.1 M
3. Acido acético
4. Àcido sulfúrico 0.5 M
5. Antígeno
6. Conjugado de peroxidasa – anticuerpo monoclonal
7. Dimetil sulfóxido (DOMOSO)
8. Peróxido de Hidrógeno al 30 %
9. Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2
- 10- Suero control negativo
- 11- Tetra metil benzidine (TMB)
- 12- Tween 20

Condiciones ambientales de laboratorio a temperatura óptima de 18 a 26 °C

Procedimiento de la prueba:

1. Preparar el conjugado, antígeno y suero a temperatura ambiente.
2. Adicionar 50 µl del suero de referencia 1) (muy positivo) para el pozo A1 y B1 de la placa de prueba.
3. Adicionar 50 µl del suero de referencia 2) (medianamente positivo) para el pozo C1 y D1 de la placa de prueba.
4. Aplicar 50 µl del suero de referencia 3) (medianamente negativo) para el pozo E1 y F1 de la placa de prueba.
5. Aplicar 50 µl del suero de referencia 4) (totalmente negativo) para el pozo G1 y H1 de la placa de prueba.
6. Aplicar 50 µl de los sueros problema en dilución, en cada uno de los pozos correspondientes de la placa de prueba.
7. Aplicar 50 µl de el conjugado diluido de 1:30, en los pozos de la placa de prueba.

8. Aplicar 50 µl del antígeno diluido de 1:30, en los pozos de la placa de prueba.
9. Sellar la placa con papel sello.
10. Agitar suavemente los pozos de la placa de prueba durante 10 segundos.
11. Incubar la placa con la solución de cromógeno sustrato a temperatura ambiente durante 90 minutos.
12. Vaciar los pozos de la placa y lavar con solución de lavado 600 ml de PBS + 300 µl de Tween 20 para una placa, en 3 tiempos o periodos de solución.
13. Aplicar 100 µl de la solución de cromógeno sustrato a todos los pozos de la placa.
14. Incubar la placa a temperatura ambiente durante 15 – 20 minutos.
15. Detener la reacción mediante la adición de 10 µl de ácido sulfúrico 0.5 M en todos los pozos.
16. Leer inmediatamente la placa en un lector de ELISA a una densidad óptima de 450 nm.

Fórmula para calcular resultados

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{100 - (\text{DO de la muestra}) \times 100}{(\text{DO} \times \text{del Suero de referencia} \ 4)}$$

Interpretación de resultados:

0 – 30 % de Inhibición = negativos a anticuerpos

31 – 50 % de Inhibición = sospechosos, repetir la prueba

51 – 100 % de Inhibición = positivo a anticuerpos

## MEDIOS DE CULTIVO PARA AISLAMIENTO DE MICOPLASMAS

### a) Medio líquido de Friis

Se realizo a partir de medios comerciales como PPLO Broth w/o CV (Laboratorios Difco) y Brain Heart Infusión (Laboratorios difco); El medio se esterilizo en autoclave a 121° y 15 libras de presión, durante 15 minutos y se mantuvo a temperatura de 45 a 50 ° en baño maría. Posteriormente se adiciono, en forma aséptica por filtración con cartuchos Millipore con membranas Millipore de 0.22 µm, suero de cerdo estéril, suero de caballo estéril, extracto de levadura estéril, marcador de color e inhibidores. El medio ya preparado se distribuyo en tubos de 13 × 100 mm estériles con tapón de goma, a razón de 5 ml en cada tubo.

Fórmula del Medio de Friis:

|   |          |
|---|----------|
| *Agua desionizada                             | 225.0 ml |
| Solución salina balanceada modificada de Hank | 152.0 ml |
| Extracto de levadura                          | 18.0 ml  |
| *Infusión cerebro corazón (BHI, Difco)        | 2.5 g    |
| *Caldo PPLO (Difco)                           | 2.5 g    |
| Suero de Caballo inactivado (56 °/ 15 min)    | 40.0 ml  |
| Suero de Cerdo inactivado a (56 °/15 min)     | 60.0 ml  |
| *Rojo de fenol (Sol. 0.2 %)                   | 3.5 ml   |
| *DNA  | 0.02 mg  |
| Penicilina 1,800,000 UI                       | 2.0 ml   |

Se ajusto el pH a 7.4 con solución al 7.5 % de NaHCO<sub>3</sub>.(\* se esterilizó en autoclave).

### b) Medio sólido de Friis:

|                                       |          |
|---------------------------------------|----------|
| *Agua desionizada                     | 450.0 ml |
| *Infusión cerebro corazón (BHI,Difco) | 5.0 g    |
| *PPLO caldo (Difco)                   | 5.0 g    |
| *Agar noble (Difco)                   | 9.0 g    |
| *Rojo de fenol (sol. 0.2 %)           | 7.0 ml   |
| *DNA                                  | 0.02 g   |

Se ajusto el pH a 7.6 con una solución 0.1 N de NaOH y se esterilizó en autoclave manteniéndose a 45 – 50 ° en baño maría para agregarle en forma aséptica los siguientes compuestos:

|   |          |
|---|----------|
| Solución salina balanceada modificada de Hank | 305.0 ml |
| Suero de Caballo inactivado                   | 80.0 ml  |
| Suero de Cerdo inactivado                     | 120.0 ml |
| Extracto de levadura                          | 36.0 ml  |
| Penicilina 3,600,000 UI                       | 2.0 ml   |

Se mezclaron los ingredientes y se distribuyeron en cajas de petrí de 100 mm de diámetro. (\* se esterilizó en autoclave).

c) Solución Salina Balanceada Modificada de Hank:  
Disolver en el orden que se presenta

|                                       |          |
|---------------------------------------|----------|
| Solución "A"                          |          |
| Agua desionizada                      | 400.0 ml |
| Na Cl                                 | 80.0 g   |
| K Cl                                  | 4.0 g    |
| MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O | 1.0 g    |
| MgCl <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O | 1.0 g    |
| Ca Cl <sub>2</sub>                    | 1.4 g    |
| Agua desionizada hasta                | 500.0 ml |

|   |          |
|---|----------|
| Solución "B"  |          |
| Agua desionizada                                      | 400.0 ml |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12 H <sub>2</sub> O | 1.5 g    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                       | 0.6 g    |
| Agua desionizada hasta                                | 500.0 ml |

Al momento de su uso 25 ml de la Solución "A" se mezclaron con agua desionizada hasta 400 ml, después se agregaron 25 ml de la Solución "B" y se aforó con agua desionizada hasta 500 ml. (Ciprián, 1978 y 1987).

## TÉCNICA CUENTA LEUCOCITARÍA

### a) CUENTA LEUCOCITARIA

Fundamento:

La sangre se diluye 1: 2 con una solución hipotónica de ácido acético que destruye a los eritrocitos.

El azul de metileno permite reconocer fácilmente el líquido y observar mejor los glóbulos blancos, a los que tiñe ligeramente.

Material:

- Tubos de ensaye de 13 x 100 mm
- Pipeta de Thoma para glóbulos blancos
- Cámara de Neubauer
- Microscópio
- Boquillas
- Gasa
- Sangre capilar o venosa

Reactivos:

- EDTA (sal disódica) al 10 %
- Líquido de Turk:  
Ácido acético glacial 3.0 ml



Agua destilada c.b.p. 100 ml  
Adicionar 1 a 2 gotas de Azul de metileno  
Procedimiento:

- 1.- Llenar la pipeta con sangre bien mezcladas hasta la marca de .5
- 2.- Limpiar cuidadosamente la pipeta por fuera
- 3.- Aforar con solución de Turk hasta la marca de II
- 4.- Agitar la pipeta durante 3 minutos
- 5.- Se desechan las primeras 4 ó 5 gotas de la pipeta y se carga la cámara de Neubauer.
- 6.- Dejar reposar la cámara durante 3 minutos
- 7.- En el microscópio con el objetivo de 10, se cuentan los leucocitos presentes en los cuatro cuadros grandes de los extremos.
- 8.- Multiplicar por 50 el promedio de los leucocitos con la siguiente fórmula:  
Células contadas x 20(dilución) x 10 (corrección de altura)/ 4(número de cuadros contados de 1mm).

Valores de Referencia:  
Leucocitos Cerdos:  
11,000 a 22,000/ mm<sup>3</sup>

#### b) CUENTA DIFERENCIAL LEUCOCITARIA

Fundamento:

La cuenta leucocitaria diferencial es el conteo del número de los distintos tipos de leucocitos. Identifica a los individuos con una mayor susceptibilidad a la infección.

Valores de referencia:  
Cerdos:  
Linfocitos: 3,290 – 13,640  
Neutrófilos segmentados: 3,080 – 10,340  
Monocitos: 2,20 – 2,200

#### TINCIÓN DE WRIGTH

Fundamento:

La tinción de Wrigth es una tinción tipo Romanowsky, es importante esta tinción ya que puede obtenerse una cantidad abundante de información a partir del examen de un frotis de sangre periférica bien teñido.

La tinción de Romanowsky consiste en Azul de metileno y sus productos de oxidación, así como eosina B o eosina Y. La acción combinada de estos colorantes produce el efecto Romanowsky y da una coloración púrpura a los núcleos de los leucocitos y a los gránulos neutrofilicos y de color rosado a los eritrocitos. Los componentes de este efecto son el azul B y la eosina Y.

Las propiedades de tinción de Romanowsky dependen del enlace de los colorantes a las estructuras químicas y de las interacciones del azul B y la eosina Y. Los

agrupamientos de ácidos nucleicos, las proteínas de los núcleos celulares y el citoplasma inmaduro reactivo, fijan el azul B, colorante básico.

La eosina Y, colorante ácido, se fija a los agrupamientos básicos de las moléculas de hemoglobina y a las proteínas básicas.

Material:

- \* Frotis sanguíneo
- \* Agua destilada
- \* Eosina B
- \* Eosina Y
- \* Azul de metileno
- \* Alcohol metílico

Procedimiento:

- 1.- Hacer un frotis sanguíneo, ni demasiado delgado, ni que llegue al extremo de portaobjeto.
- 2.- Fijar el frotis con alcohol metílico y dejar secar
- 3.- Agregar el colorante 1, durante 5 ó 6 segundos
- 4.- Lavar y sacudir para eliminar exceso
- 5.- Agregar el colorante 2, por 6 a 8 segundos
- 6.- Lavar y dejar secar
- 7.- observar al microscopio

(Vargas, 2000).

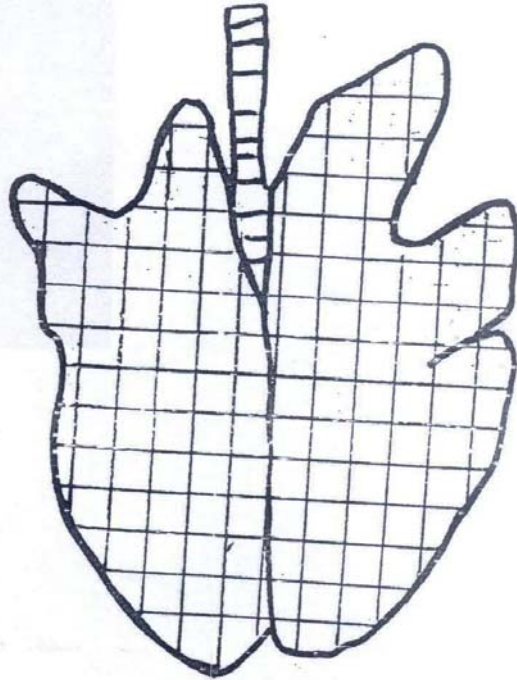
**FIGURAS DORSAL Y VENTRAL DEL PORCENTAJE DE LESIÓN PULMONAR**

FIGURA No.1

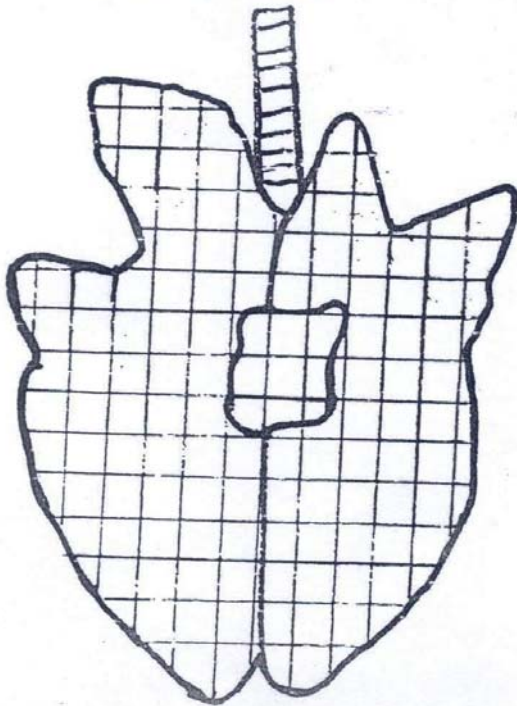
GRUPO D VACUNADO Mh MÁS RS-100

CERDO No. 710

VISTA DORSAL



VISTA VENTRAL



OBSERVACIONES

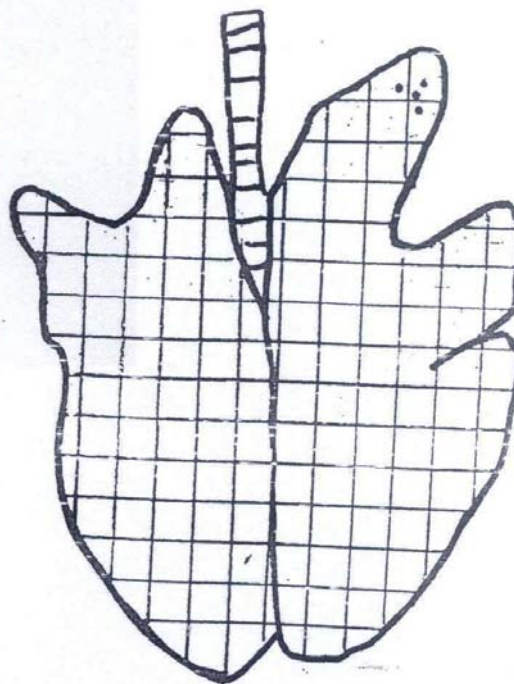
0 %

FIGURA No.2

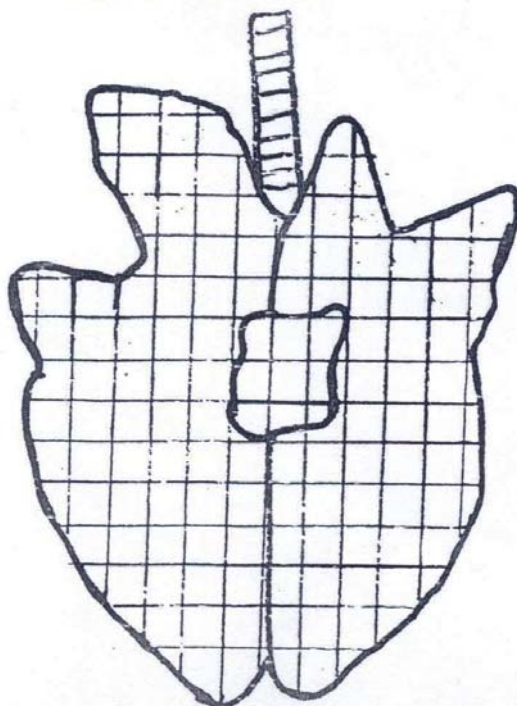
GRUPO D VACUNADO Mh MÁS RS-100

CERDO No. 711

VISTA DORSAL



VISTA VENTRAL



OBSERVACIONES

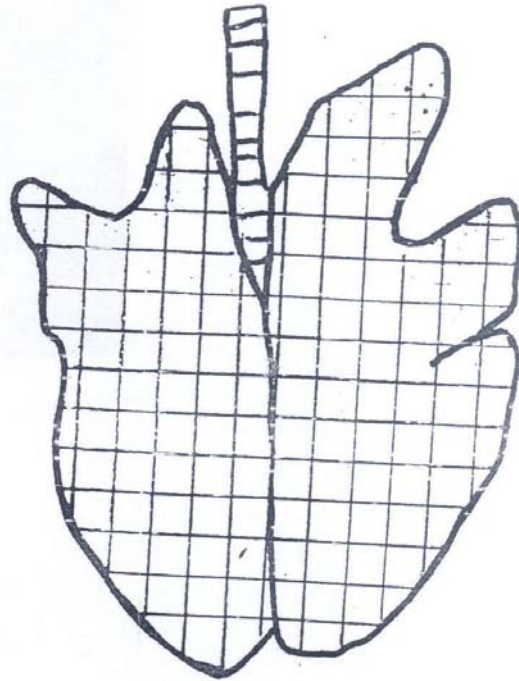
0.01%

FIGURA No. 3

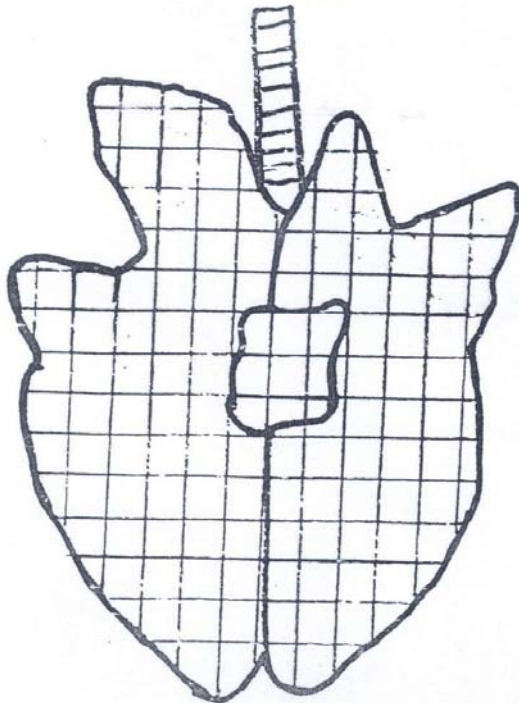
GRUPO D VACUNADO Mh MÁS RS-100

CERDO No. 715

VISTA DORSAL



VISTA VENTRAL



OBSERVACIONES

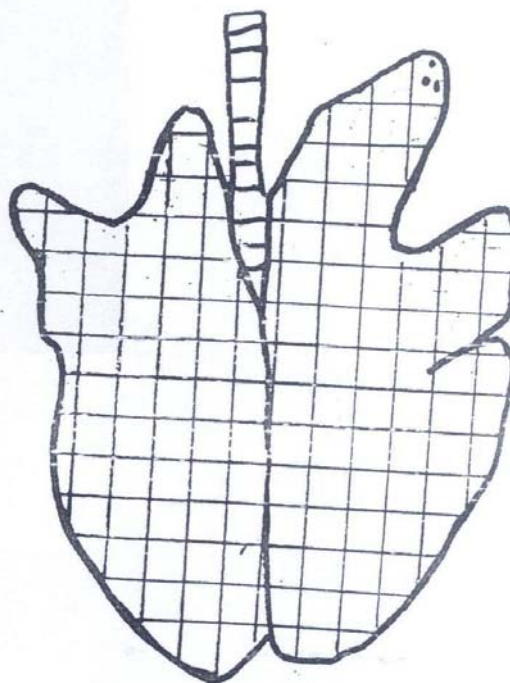
0 %

FIGURA No.4

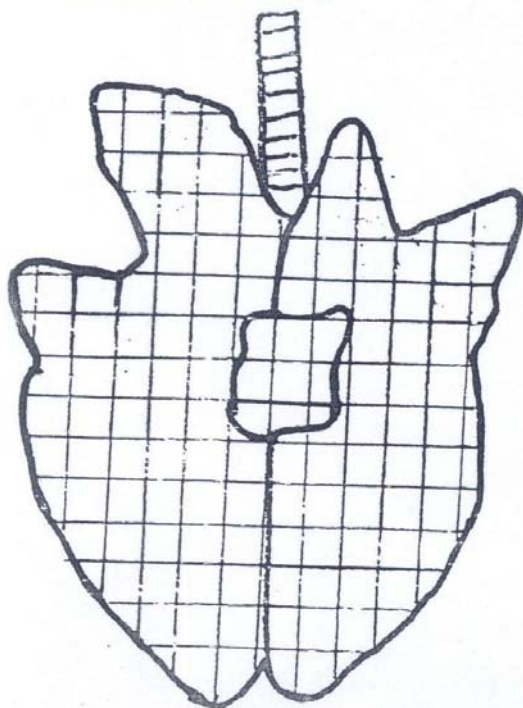
GRUPO D VACUNADO Mh MÁS RS-100

CERDO No. 718

VISTA DORSAL



VISTA VENTRAL



OBSERVACIONES

0.05 %

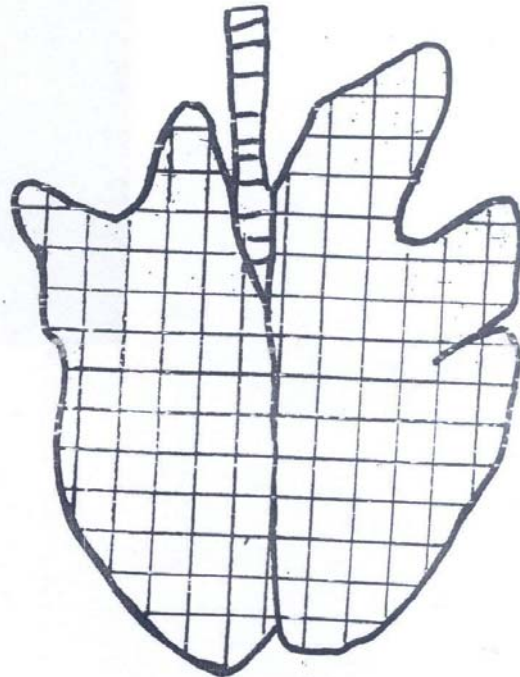


FIGURA No.5

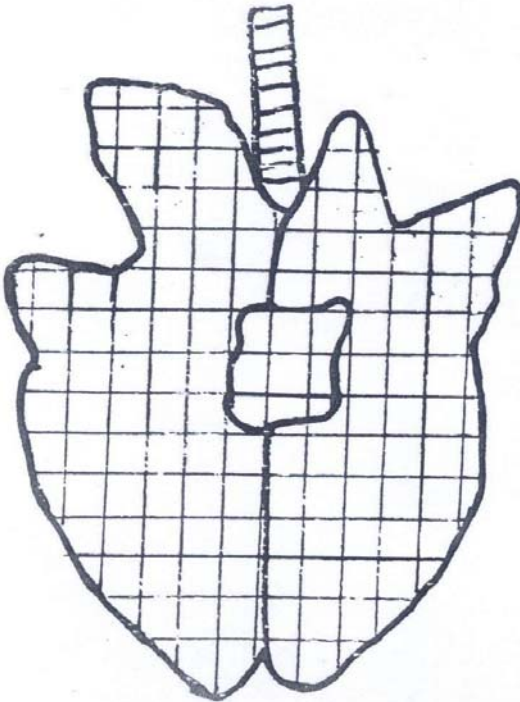
GRUPO C VACUNADO Mh

CERDO No. 707

VISTA DORSAL



VISTA VENTRAL



OBSERVACIONES

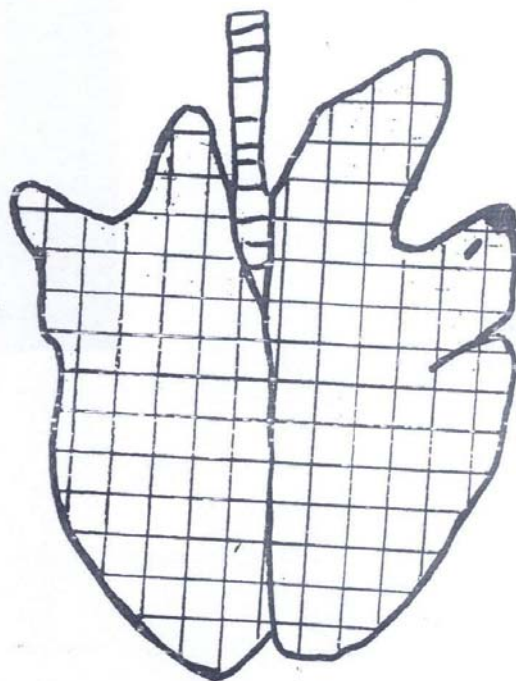
0 %

FIGURA No.6

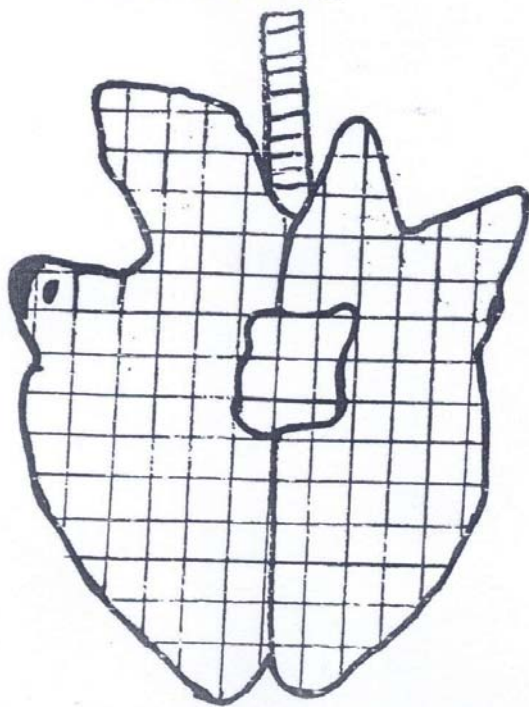
GRUPO C VACUNADO Mh

CERDO No. 713

VISTA DORSAL



VISTA VENTRAL



OBSERVACIONES

0.9%

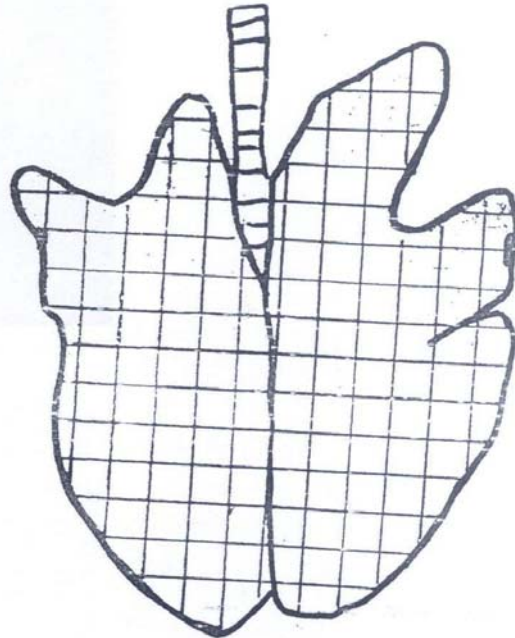


FIGURA No.7

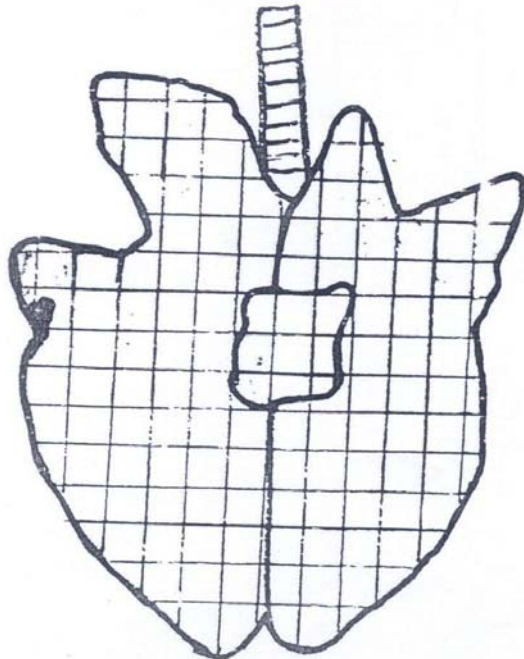
GRUPO C VACUNADO Mh

CERDO No. 714

VISTA DORSAL



VISTA VENTRAL



OBSERVACIONES

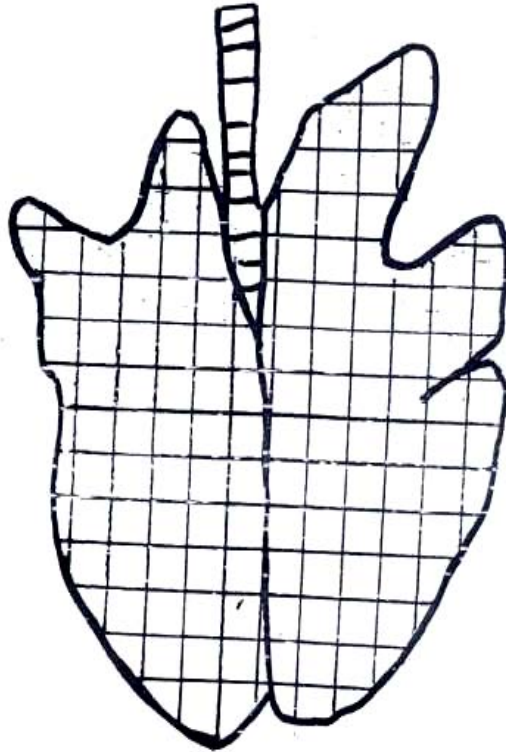
0.6 %

FIGURA No. 8

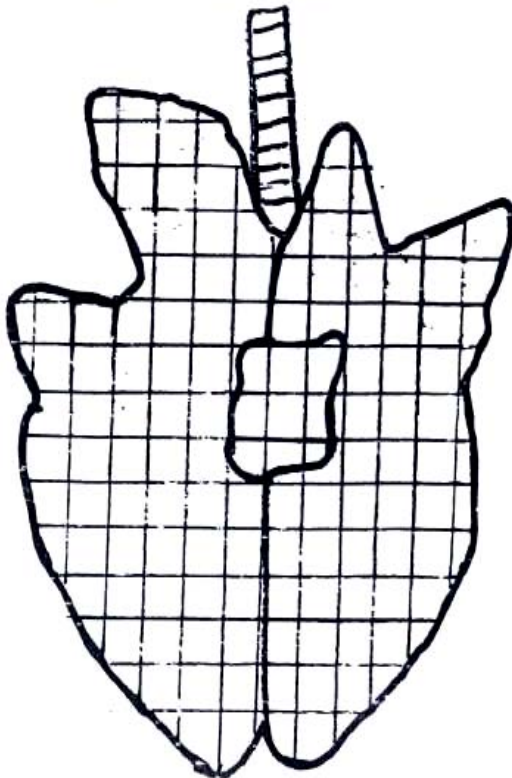
GRUPO C VACUNADO Mh

CERDO No. 719

VISTA DORSAL



VISTA VENTRAL



OBSERVACIONES

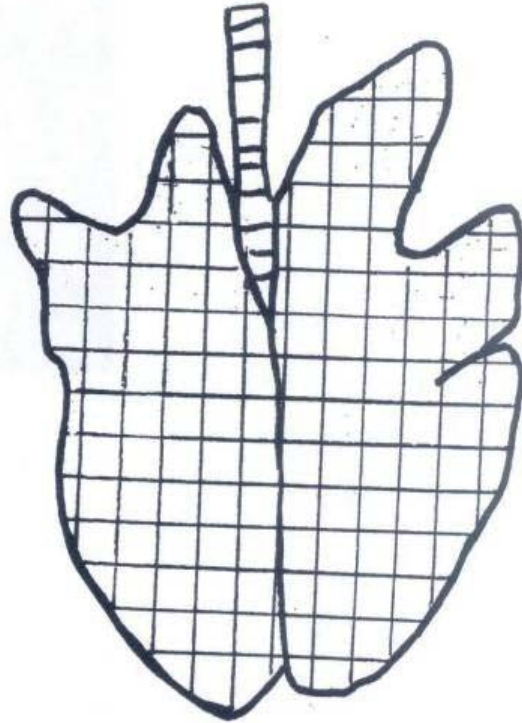
0 %

FIGURA No.9

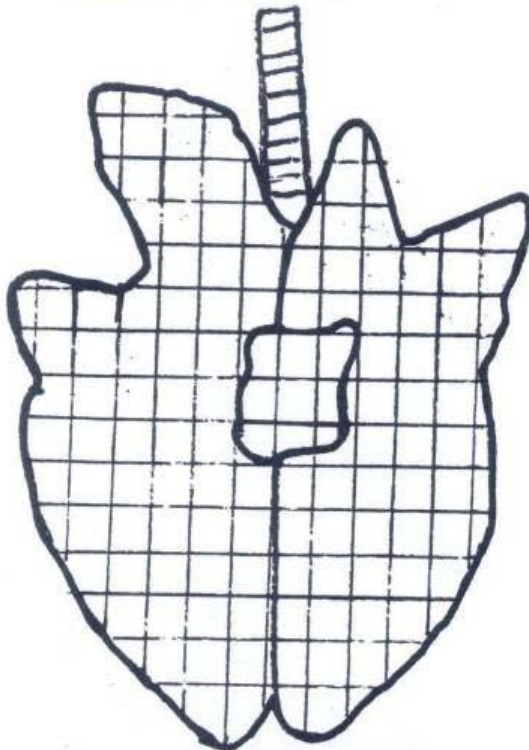
GRUPO B SÓLO RS-100

CERDO No. 708

VISTA DORSAL



VISTA VENTRAL



OBSERVACIONES

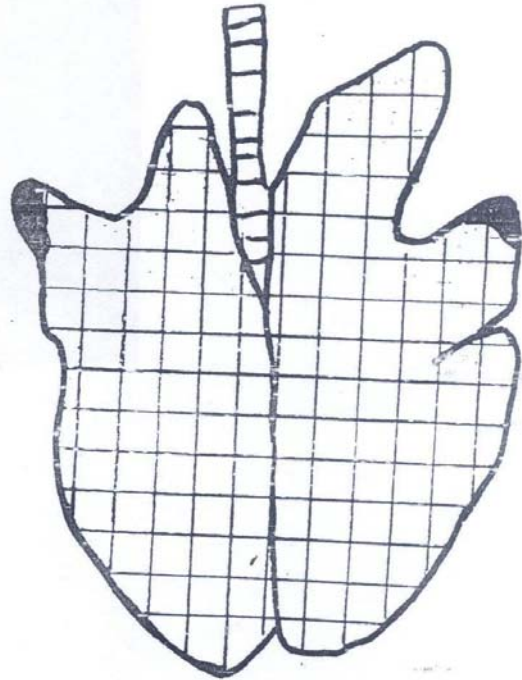
SCPA

FIGURA No. 10

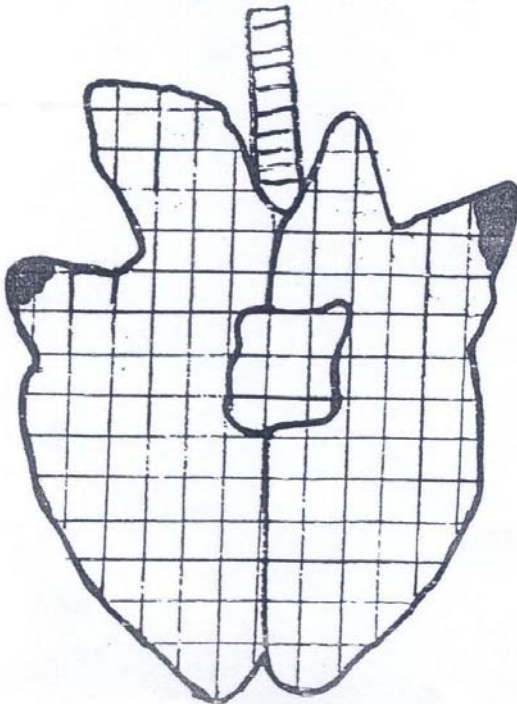
GRUPO B SÓLO RS-100

CERDO No. 709

VISTA DORSAL



VISTA VENTRAL



OBSERVACIONES

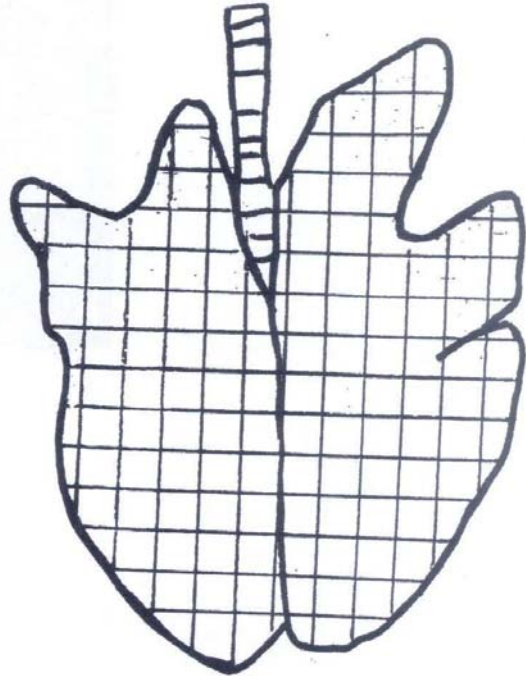
4.2 %

FIGURA No.11

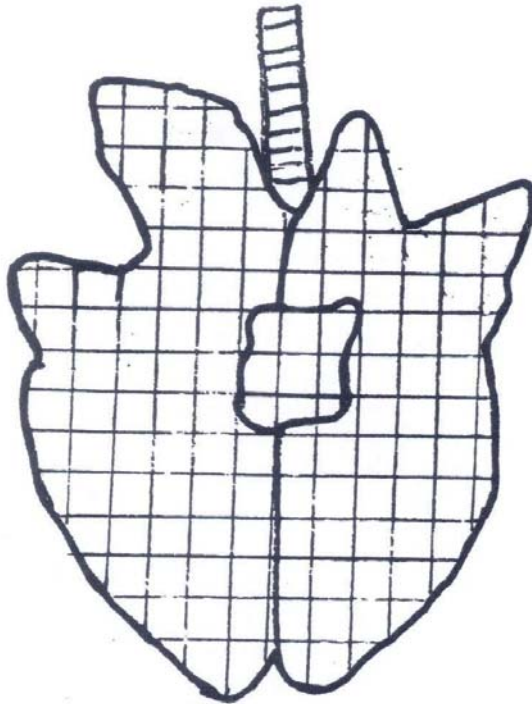
GRUPO B SÓLO RS-100

CERDO No. 712

VISTA DORSAL



VISTA VENTRAL



OBSERVACIONES

SCPA

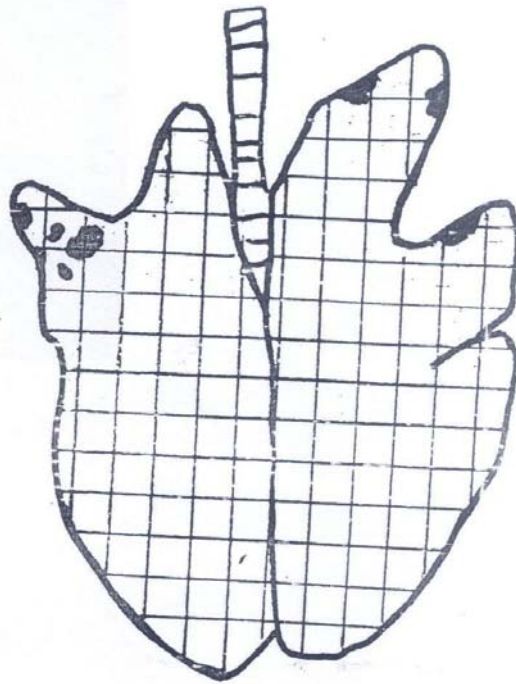


FIGURA No. 12

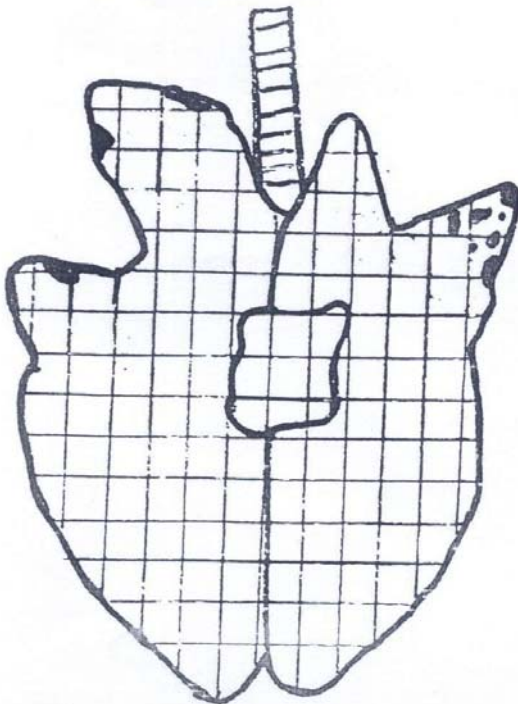
GRUPO B SÓLO RS-100

CERDO No. 716

VISTA DORSAL



VISTA VENTRAL



OBSERVACIONES

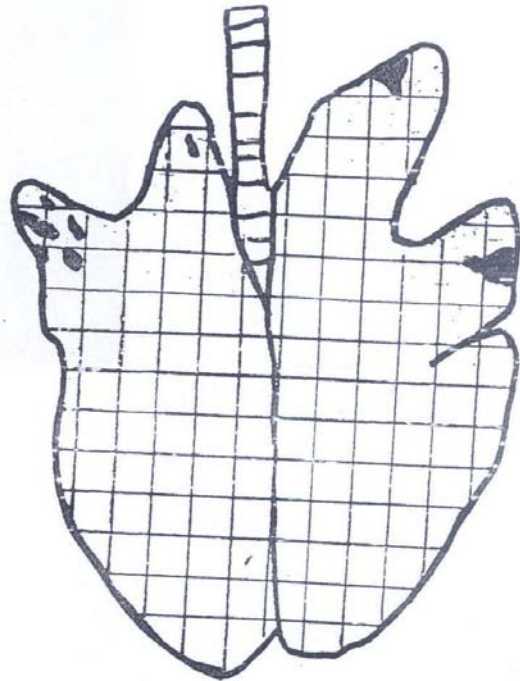
2.2%

FIGURA No.13

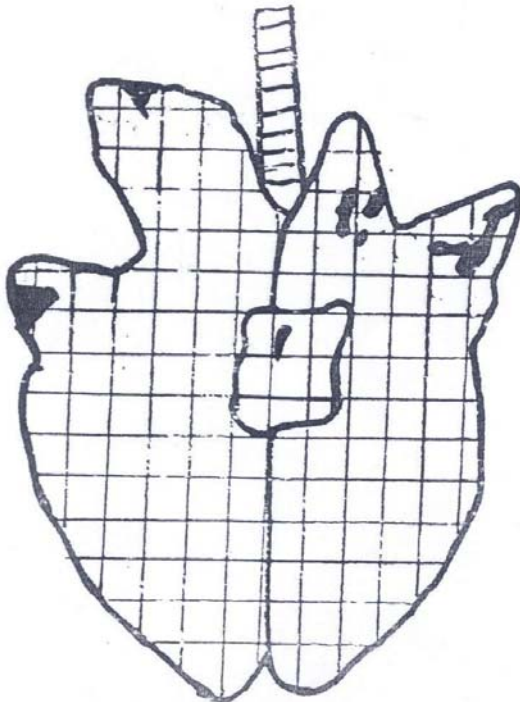
GRUPO A INOCULADO CON Mh

CERDO No. 717

VISTA DORSAL



VISTA VENTRAL



OBSERVACIONES

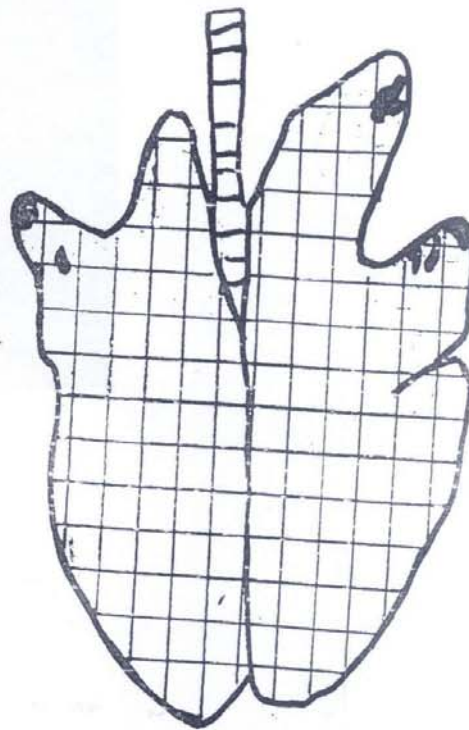
3.6 %

FIGURA No.14

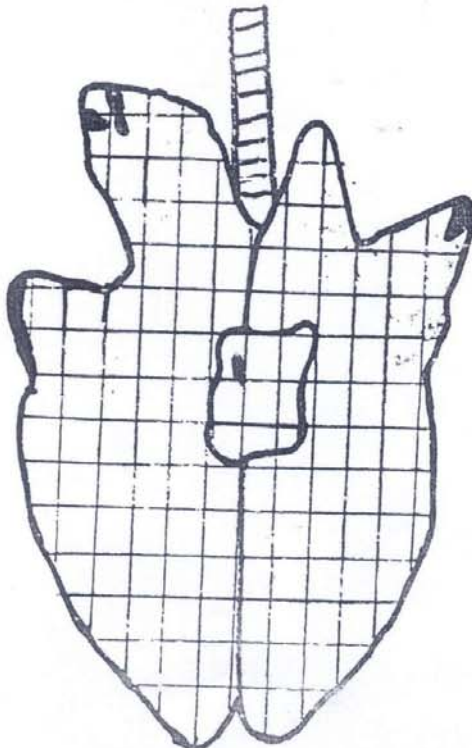
GRUPO A INOCULADO CON Mh

CERDO No. 720

VISTA DORSAL



VISTA VENTRAL



OBSERVACIONES

3.2 %

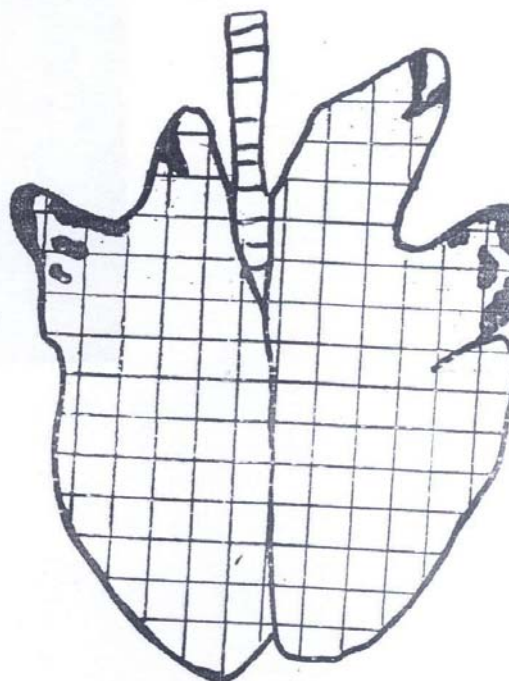


FIGURA No.15

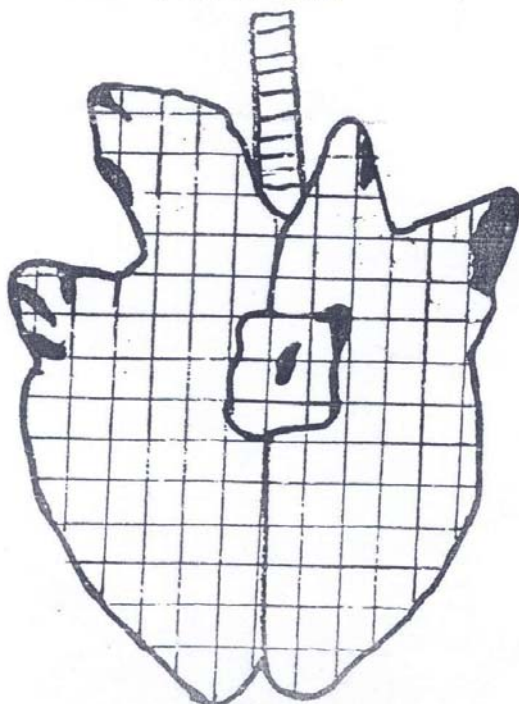
GRUPO A INOCULADO CON Mh

CERDO No. 721

VISTA DORSAL



VISTA VENTRAL



OBSERVACIONES

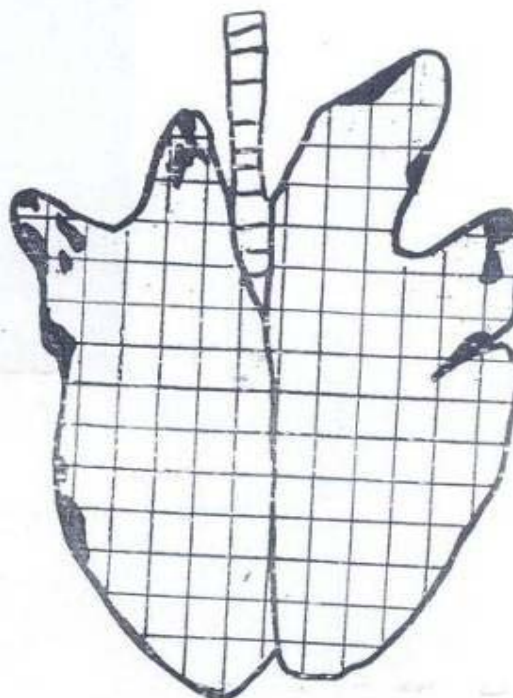
10.0%

FIGURA No.16

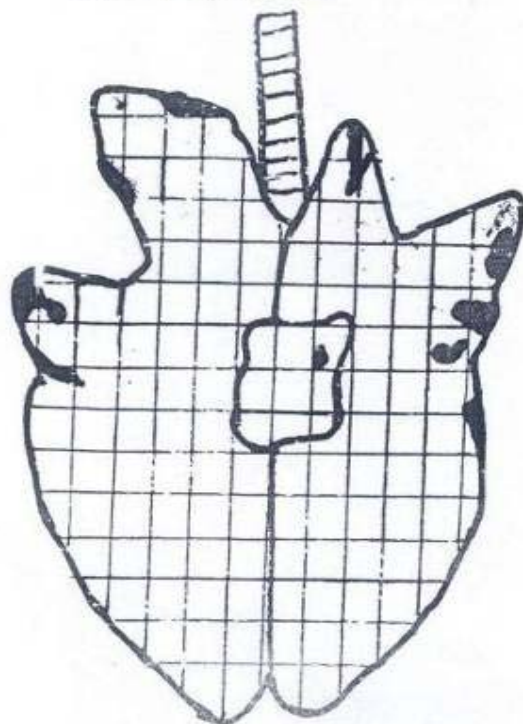
GRUPO A INOCULADO CON Mh

CERDO No. 722

VISTA DORSAL



VISTA VENTRAL



OBSERVACIONES

5.6%