

11661
1
rey



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores
CUAUTITLÁN

EVALUACION DE DOS INMUNOGENOS DE *Mycoplasma hyopneumoniae* EN CERDOS CONVENCIONALES

FALLA DE ORIGEN

T E S I S

PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
(AREA : MICROBIOLOGIA)

POR

TONATIUTH ALEJANDRO CRUZ SANCHEZ

Directores.

Dra. G. MIREYA DE LA GARZA A.
Dr. en C. J. ABEL CIPRIAN CARRASCO



1991



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

" Primero preguntate : Que he hecho para mi educación ?
y al adelantar gradualmente. Que he hecho por mi Patria ?
hasta que llegue el momento en que puedas tener la inmensa
dicha de pensar que has contribuido de alguna manera al
progreso de la Humanidad "

LUIS PASTEUR



Este trabajo fue realizado en los laboratorios de la Coordinación General de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (U.N.A.M.) y en la Granja y el laboratorio 52 de Biología Celular, del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N.

Este trabajo fue apoyado por el COSNET : 506/86.

MIEMBROS DEL JURADO

PRESIDENTE	M.V.Z. PhD. ELISEO HERNANDEZ B.
VOCAL	M.V.Z. Dr. en C. ABEL CIPRIAN C.
SECRETARIO	M.V.Z. PhD. ROBERTO CERVANTES O.
PRIMER SUPLENTE	Dra. en C. MIREYA DE LA GARZA.
SEGUNDO SUPLENTE	M. en C. CLARA INES ALVAREZ.

CONTENIDO

	Pag.
Resumen	a
Abstract	b
Lista de cuadros	c
Lista de figuras	c
1. INTRODUCCION.	1
1.1 Características generales de <u>Mycoplasma hyopneumoniae</u> .	2
1.2 Antígenos de <u>Mycoplasma hyopneumoniae</u> .	3
1.3 Inmunidad.	5
1.4 Control de la Neumonía Enzootica mediante vacunación.	e
1.5 Producción de cerdos libres de micoplasma.	16
1.6 Profilaxia con antibióticos.	17
2. HIPOTESIS DE TRABAJO.	19
3. MATERIALES Y METODOS.	21
3.1. MATERIALES.	21
3.1.1 Preparación del inmunógeno de <u>M. hyopneumoniae</u> .	21
3.1.1.1 Producción de <u>M. hyopneumoniae</u> .	21
3.1.1.2 Producción del adyuvante.	21
3.1.2 Prueba de inocuidad del adyuvante.	21
3.1.3 Grupos experimentales.	22
3.1.4 Histopatología.	22
3.1.5 Cultivo y aislamiento de microorganismos.	22
3.1.5.1 Medios de cultivo para micoplasmas.	22
3.1.5.2 Medios de cultivo para corinebacterias.	24
3.1.5.3 Medios de cultivo para pasteurelas.	24

3.1.5.4 Medios de cultivo para bordetelas.	24
3.1.6 Medios y pruebas de diferenciación bioquímica.	25
3.1.6.1 Micoplasmas.	25
3.1.6.1.1. Medio de hidrólisis de la arginina.	25
3.1.6.1.2 Medio de la glucosa.	25
3.1.6.1.3 Prueba de la dependencia de esteroides.	26
3.1.6.1.4 Prueba de producción de peróxido de hidrógeno.	26
3.1.6.2 Pasteurelas y bordetelas.	26
3.1.7 Prueba de inmunofluorescencia.	26
3.1.7.1 Antisuero contra <u>M. hyopneumoniae</u> .	26
3.1.7.2 Conjugado de antigamaglobulina de conejo preparado en cabras.	26
3.1.7.3 Soluciones.	27
3.1.7.4 Equipo.	27
3.2 METODOS.	28
3.2.1 Preparación del inmunógeno de <u>M. hyopneumoniae</u> .	28
3.2.1.1 Producción de <u>M. hyopneumoniae</u> .	28
3.2.1.2 Producción del adyuvante.	29
3.2.1.3 Preparación del inmunógeno con el adyuvante.	30
3.2.1.4 Prueba de inocuidad del adyuvante.	30
3.2.2. Producción del homogenizado pulmonar con <u>M. hyopneumoniae</u> cepa 194 para el desafío.	30
3.2.3 Grupos experimentales.	31
3.2.4 Temperatura corporal y signos respiratorios.	32
3.2.5 Evaluación de las lesiones macroscópicas.	32
3.2.6 Histopatología.	33
3.2.7 Cultivo y aislamiento de microorganismos.	33

3.2.7.1 Aislamiento de <u>M. hyopneumoniae</u> .	33
3.2.7.1.1 Prueba de dependencia de esteroles.	33
3.2.7.1.2 Prueba de hidrólisis de la arginina.	33
3.2.7.1.3 Prueba de fermentación de la glucosa.	33
3.2.7.1.4 Prueba de producción de peróxido de hidrógeno.	35
3.2.7.2 Aislamiento e identificación de otras bacterias.	35
3.2.8 Prueba de inmunofluorescencia indirecta.	36
3.2.8.1 Controles.	36
3.2.8.2 Preparación de las muestras.	36
3.2.8.3 Técnica de inmunofluorescencia indirecta.	36
4. RESULTADOS.	38
4.1 Cultivo de <u>M. hyopneumoniae</u> .	38
4.2 Preparación del inmunógeno.	38
4.2.1 Preparación del antígeno de <u>M. hyopneumoniae</u> .	38
4.2.2 Preparación del adyuvante.	38
4.2.3 Prueba de inocuidad.	39
4.3 Vacunación de los cerdos de los grupos experimentales.	43
4.3.1 Evolución de los signos clínicos en los cerdos de los grupos experimentales.	43
4.3.1.1 Temperatura.	43
4.3.1.2 Signos respiratorios.	43
4.3.1.2.1 Tos.	43
4.3.1.2.2 Disnea.	44
4.4 Lesiones macroscópicas.	44
4.5 Lesiones microscópicas.	45

4.6 Microorganismos recuperados.	45
4.7 Identificación de <u>M. hyopneumoniae</u> por inmunofluorescencia indirecta.	52
5. DISCUSION.	54
6. CONCLUSIONES.	65
7. BIBLIOGRAFIA.	66

RESUMEN.

Se evaluaron dos diferentes inmunógenos elaborados a partir de Mycoplasma hyopneumoniae y administrados en cerdos por vía intraperitoneal. Se emplearon 12 cerdos convencionales machos, raza Yorkshire de 8 semanas de edad. Con ellos se formaron tres grupos experimentales de 4 cerdos cada uno: Grupo I, inoculado con 2.0 ml. de medio de Friis por vía intraperitoneal (I/P); Grupo II, inoculados con 2.0 ml de una suspensión de M. hyopneumoniae a base de células completas sin adyuvante por vía I/P; Grupo III, inoculado con 2.0 ml de una suspensión de M. hyopneumoniae a base de células completas en adyuvante oleoso por vía intraperitoneal. Todos los cerdos se desafiaron por vía intratraqueal con 20 ml. de homogeneizado pulmonar, conteniendo M. hyopneumoniae cepa 194, el día 28 postvacunación. Los cerdos se sacrificaron el día 50 postvacunación (32 días postdesafío) y se evaluaron las lesiones macroscópicas de los pulmones y se tomaron muestras de ellos para los estudios bacteriológicos e histopatológicos. También se tomaron muestras de cornetes nasales para su estudio bacteriológico. Se encontró en el grupo I una media de 13% de lesión neumónica, mientras que en los grupos II y III fueron de 3 y 6% respectivamente; las lesiones neumónicas encontradas correspondieron a zonas de consolidación rojiza y resolutivas. El adyuvante empleado no produjo lesiones en peritoneo visceral o parietal. Por lo menos en un cerdo de cada grupo se encontraron lesiones microscópicas caracterizadas por una infiltración linfocitaria peribronquial. El aislamiento de M. hyopneumoniae se logró de cuatro animales, uno del grupo I, uno del II y dos del grupo III. El estudio bacteriológico general reveló que por lo menos un cerdo de cada grupo tenía Pasteurella multocida. Las lesiones encontradas en los cornetes nasales variaron en grado y aspecto, de ellas se aisló Bordetella bronchiseptica y P. multocida. Los resultados que se obtuvieron en este ensayo, basados en las lesiones encontradas, mostraron que la vacuna de M. hyopneumoniae sin adyuvante y aplicada por vía intraperitoneal induce mejor protección contra el desafío experimental con el homogeneizado pulmonar con micoplasma. Sin embargo el aislamiento de P. multocida en un cerdo de cada grupo inmunizado, nos sugiere que la protección con los inmunógenos de M. hyopneumoniae no previno la colonización del micoplasma lo que favoreció el establecimiento de P. multocida que se encontraba presente en los cornetes nasales, en los cerdos aparentemente sanos. En este estudio se observó que al igual que para vacunas ensayadas por otros grupos de investigación, ninguno de los dos inmunógenos protegió totalmente, pues aunque se logró la disminución de las lesiones, no se previno la colonización del pulmón.

ABSTRACT.

Two Mycoplasma hyopneumoniae vaccines were evaluated in pigs. Twelve 8-weeks old conventional Yorkshire male pigs were used. Three groups were formed with four animals each one. Group I was inoculated with 2.0 ml of Friis medium intraperitoneally (I/P). Group II was inoculated with 2.0 ml of Mycoplasma hyopneumoniae whole cell suspension without adjuvant. Group III was inoculated with 2.0 ml of Mycoplasma hyopneumoniae whole cell suspension with oil adjuvant. All pigs were challenged intratracheally with 20 ml. of a M. hyopneumoniae strain 194 lung-homogenized at the 28th day post-vaccination (32 days post-challenge); macroscopic lung lesions were evaluated and lung samples were taken for bacteriological and histological analysis. In group I, the mean of pneumonic lesion was 13 %. In groups II and III the mean of pneumonic lesion were 3 and 6 % respectively. Red consolidation and resolute zones were common lesions found in lungs. The adjuvant that we used was not a cause of injury neither in visceral nor parietal peritoneum. At least one pig per group developed microscopic lesions characterized by a peribronchial lymphocytes infiltration. M. hyopneumoniae was isolated from one animal of groups I and II and from two pigs of group III. The bacteriological analysis showed that at least one pig from each group had Pasteurella multocida. The lesions in nasal turbinates varied in degree and appearance and Bordetella bronchiseptica and P. multocida were isolated from these samples. The necropsial and histopathological results showed that the M. hyopneumoniae vaccine without adjuvant administered intraperitoneally led to a better protection against the M. hyopneumoniae lung-homogenized experimental challenge than the vaccine with adjuvant. Nevertheless, isolating P. multocida from one pig out of groups II and III suggest that none of these vaccines prevented the mycoplasmae colonization, thus P. multocida settled on the nasal mucous of apparently healthy pigs. In this study we observed that as reported by other groups working with the same types of vaccine none of the products provided complete protection. The lesions decreased in the vaccinated groups, but the colonization of lung tissue by mycoplasma was not prevented.

c. LISTA DE CUADROS.

	Pag.
1. Pruebas serológicas desarrolladas para el diagnóstico de la Micoplasmosis Porcina.	7
2. Evolución de los inmunógenos utilizados para la prevención de la Neumonía Enzoótica.	10
3. Antibióticos empleados en el control de la Neumonía Enzoótica.	18
4. Diagrama para el cultivo, aislamiento e identificación de <u>Mycoplasma hyopneumoniae</u> .	34
5. Lecturas de absorbancia a diferentes tiempos de incubación del cultivo de <u>Mycoplasma hyopneumoniae</u> .	40
6. Lecturas de absorbancia a diferentes tiempos de incubación del cultivo de <u>Cornebacterium ovis</u> .	40
7. Distribución de las lesiones macroscópicas en los lóbulos pulmonares.	47
8. Microorganismos presentes en el pulmón y cornetes nasales de los cerdos posdesafiados.	50

d. LISTA DE FIGURAS.

1. Peritoneo sin cambios patológicos aparentes en el cerdo que fue empleado para la prueba de inocuidad del adyuvante.	41
2. Granuloma en tejido subcutáneo localizado en la región abdominal en un cerdo inoculado con adyuvante, el cual no penetró en la cavidad peritoneal.	41
3. Aspecto del granuloma al corte encontrado en el cerdo inoculado con adyuvante solo, que no penetró a la cavidad peritoneal.	42
4. Reacción inflamatoria localizada en el sitio subcutáneo, en donde fue aplicado el adyuvante. Se aprecian gotas liposolubles del adyuvante (●), células mononucleares (◁) y células gigantes (◀).	42

	d
5. Promedios y lesiones encontradas en los cerdos de los grupos experimentales.	46
6. a y b. Areas resolutivas típicas de casos de Neumonía Enzoótica encontradas en los lóbulos anteriores de algunos cerdos inoculados con <u>M. hyopneumoniae</u> .	48
7. Lesión de consolidación rosa en el lóbulo cardiaco derecho de un cerdo inoculado con <u>M. hyopneumoniae</u> .	49
8. Colonias de <u>Mycoplasma hyopneumoniae</u> aisladas a partir de los pulmones neumónicos (40X).	51
9. Sección de pulmón fetal tomado como control negativo (32 X)	52
10. Sección de pulmón neumónico positivo a la prueba de inmunofluorescencia indirecta, en el que se aprecian colonias de <u>M. hyopneumoniae</u> (⬆) sobre el epitelio ciliado (100X).	53
11. Sección de pulmón neumónico positivo a la prueba de inmunofluorescencia indirecta, en el que se muestra sobre el epitelio ciliado colonias de <u>M. hyopneumoniae</u> (⬆) (400X).	53

1. INTRODUCCION.

Las pérdidas económicas que originan los problemas respiratorios del cerdo son la preocupación mundial de los que se dedican a la producción porcina. Existen datos que indican que al afectarse el tejido pulmonar, esto se refleja en pérdidas de crecimiento corporal del cerdo, así Bassine et al (1971) considera que apartir de un 15 % de lesión pulmonar el animal va perdiendo 1.15 kg de peso. Burch (1982) estableció que cuando en un cerdo están afectados todos sus lóbulos pulmonares, tiene un decremento del crecimiento en un 80 % y Pijoan (1982) indica que por cada 10% de tejido pulmonar afectado, el animal sufre un retraso en el crecimiento del 5% (Pijoan, 1982).

La investigación actual está enfocada a comprender las diversas enfermedades respiratorias tales como la pleuroneumonía contagiosa, neumonía enzoótica, pasteurelisis y la rinitis atrófica, para así controlarlas adecuadamente. Se reconoce que la "Neumonía Enzoótica" es una enfermedad de importancia en la producción porcina, por su alta incidencia (75%) lo que implica elevadas pérdidas económicas (Armstrong, 1982; Morrison et al..1986; Pointon, 1985 a).

Mycoplasma hyopneumoniae es el agente etiológico primario de la Neumonía Enzoótica (Hannan et al., 1984; Hodges, 1969). Cuando este microorganismo está ausente en los cerdos de crecimiento y finalización, el daño económico es menor. La importancia del micoplasma puede ser sobrevaluada si se piensa que esta bacteria por sí sola puede causar dicha neumonía, pues es una enfermedad clásica con determinados

signos clínicos y alteraciones patológicas típicas del pulmón, de origen multifactorial (Ross, 1984; Pffifer y Ross, 1983 ; Pointon, 1985 a; Yaghiashi,1984).

1.1 Características generales de M. hyopneumoniae.

La posibilidad de que un micoplasma estuviera involucrado en la Neumonía Enzootica fue investigada por dos grupos: uno en Iowa, en E.U.A. y otro en Cambridge, Inglaterra. Ambos reportaron en 1965 un micoplasma que producía neumonía típica en los cerdos, al cual los americanos llamaron M. hyopneumoniae y los ingleses M. suis pneumoniae; posteriormente, mediante la prueba de inhibición metabólica, se demostró que eran serológicamente idénticos (Armstrong, 1982). El Comité de Nomenclatura de Micoplasmas dió prioridad al uso de M. hyopneumoniae (Pijoan, 1982).

El microorganismo se caracteriza por no pasar filtros de 0.22 micras y ser uno de los organismos más exigentes del género Mycoplasma (Switzer y Ross, 1978). Por observación con microscopía electrónica revela la presencia de pequeños filamentos en un medio que contiene suero de equino, además de la presencia de una cápsula (Tajima et al.,1985). Es un microorganismo de crecimiento lento, tarda de 7 a 10 días en crecer y su mayor crecimiento es en medios líquidos. En medios sólidos se desarrollan colonias de 0.5 mm de diámetro, caracterizándose por no presentar la protuberancia central típica que le da la apariencia de huevo estrellado, algunos autores la observan como "gotas de rocío" (Etheridge,1979 a,Friis,1969). Cuando se tinte con Giemsa, se

observan cocobacilos delgados de 0.1 a 0.2 micrómetros de diámetro, o como pequeñas ramificaciones de 0.1 a 0.2 micrómetros de grosor. En cultivos celulares crece formando grupos difusos como cocos de 0.5 um de diámetro, en cadenas cortas o anillos de aproximadamente 3 um de diámetro conteniendo una estructura parecida a un coco.

Este agente sólo afecta en forma natural al cerdo. Los animales de experimentación como el hurón, embrión de pollo, cobayo, mono rhesus, no han mostrado susceptibilidad al agente. No hemolisa los glóbulos rojos del cerdo, caballo, vaca o pollo (Switzer and Ross, 1978).

1.2 Antígenos de M. hyopneumoniae.

El análisis antigénico de los micoplasmas es extremadamente difícil, debido al pequeño volumen de microorganismos que se obtiene (5- 20 mg/ litro de medio de cultivo). La antigenicidad se encuentra localizada en la membrana citoplasmática, especialmente en los lipopolisacáridos que cuando se asocian a proteínas, son capaces de estimular la producción de anticuerpos. Los estudios sobre la naturaleza química de los micoplasmas han sido realizados por varios autores y los resultados encontrados revelan que existen antígenos proteicos, glicolípidos y polisacáridos (Ciprián, 1979).

Ro y Ross (1983) han comparado algunas cepas de M. hyopneumoniae, encontrando una diversidad antigénica entre ellas, revelada por pruebas de inmunoelectroforesis

bidimensional. Los determinantes antigénicos son proteínas, glicolípidos y fosfolípidos que se localizan en la superficie celular. Las diferencias en la virulencia, inmunogenicidad y distribución geográfica no han sido determinadas.

Young y Ross (1987) utilizando la técnica de inmunotransferencia con las siguientes cepas de micoplasmas porcinos: M. hyopneumoniae cepas J y 194, M. flocculare cepa Ms 42 y M. hyorhinis, y los sueros de animales convalecientes de M. hyopneumoniae, M. hyorhinis y antisuero porcino de M. flocculare, encontraron que los anticuerpos detectaron cinco antígenos, estimando sus pesos moleculares en : 110, 64, 50, 41 y 36 kDa. Hallaron también que existen reacciones cruzadas entre M. hyopneumoniae con M. flocculare y M. hyorhinis. Así los antígenos de 110, 50, 41 y 36 kD de M. hyopneumoniae cruzan serológicamente con M. flocculare. El antígeno de 36 kD cruza con M. hyorhinis. El único antígeno de M. hyopneumoniae que no cruzó con los otros micoplasmas mencionados fue el 64 kD, el cual puede ser utilizado como antígeno específico para el diagnóstico de M. hyopneumoniae.

En otro trabajo Young, Yu Wei y Ross (1990) utilizando lavados bronquiales de cerdos inoculados con M. hyopneumoniae, cepa 232 y mediante la técnica de inmunotransferencia detectaron anticuerpos que reconocieron a diferentes antígenos cuyos pesos moleculares son : 200, 110, 97, 95, 80, 78, 74, 70, 60, 52, 50, 41, 36 Kd. Es de especial interés el antígeno de 97 Kd, ya que es el primero en

detectarse a partir de los 35 días postinfección por anticuerpos IGA e IgG.

Klinkert et al (1985) hacen inmunoelectrotransferencia y describen cinco antígenos, éstos se denominan como P90, P68, P50, P30 y P26. Existen evidencias de que las proteínas P90, P68 y P50 tienen localización superficial.

Poco se sabe acerca de los componentes de la superficie de los micoplasmas que contribuyen a la interacción con las células del huésped. En el caso de M. pneumoniae una proteína, la P1, ha sido involucrada dentro del proceso de parasitismo a las células blanco, así como una adhesina de 160 - 190 kD (Feldner, Gobel and Brendt, 1982).

Un antígeno proteico de M. hyorhinis (P 120) se ha observado en la superficie del organismo durante la colonización de las células del huésped. Geary y Walczak (1985, a y b) han aislado e identificado un factor citopático de M. hyopneumoniae a partir de membranas de la cepa VPP 11. Este factor es una proteína con un punto isoelectrico de 6.2 con un peso de 54 kD, capaz de inducir un efecto citopático en fibroblastos de pulmón humano (MRC-5).

1.3 Inmunidad.

En las infecciones naturales por micoplasmas es notoria una marcada respuesta de inmunidad celular, a causa de la escasa antigenicidad de estos microorganismos y a la naturaleza crónica de la enfermedad que producen. Se conocen hasta el momento una serie de eventos que se suceden, siendo

estos los que a continuación se describen.

Existe primero una interacción entre M. hyopneumoniae y células específicas localizadas en pulmón, nódulos linfoides, retrofaríngeos y bronquiales, ocurriendo la presencia de inmunoglobulinas en secreciones traqueobronquiales en una cantidad elevada a las dos semanas postinfección. Posteriormente se han observado células con inmunoglobulinas específicas en su superficie contra M. hyopneumoniae en tejidos linfoides y pulmón a las 3 y 4 semanas posinfección. Un dato significativo es que la presencia de anticuerpos coincide con la aparición de las lesiones neumónicas (Suter et al. 1985).

En una infección con M. hyopneumoniae, se observa que la proporción de células que contienen IgA:IgG es de 1:3 en mucosa nasal y en ganglios retrofaríngeos, cambiando esta proporción a 1:15 en nódulos linfoides bronquiales. En estos nódulos, a las tres semanas posinfección se encuentran todos los isotípos de inmunoglobulinas pero sobre todo la clase IgG que aparece desde la primera semana.

Se han estudiado las secreciones traqueobronquiales utilizando la técnica de ELISA encontrándose que las inmunoglobulinas IgM e IgG predominan en las primeras fases de la infección, mientras que las IgA van incrementándose progresivamente (Suter et al. 1985).

Los anticuerpos séricos tienen un comportamiento diferente al observado en las secreciones traqueobronquiales. Estos anticuerpos se detectan 5 semanas posinfección, siendo

las IgG las mas importantes detectadas por la técnica de ELISA. Se encuentran diferentes niveles de especificidad además de que se ha observado la aparición de anticuerpos por medio de diversas pruebas (Cuadro 1).

CUADRO 1
PRUEBAS SEROLOGICAS DESARROLLADAS PARA
EL DIAGNOSTICO DE LA MICOPLASMOSIS PORCINA.

Fijación de complemento.
Hemoaglutinación indirecta.
Aglutinación en tubo.
Aglutinación rápida en placa.
Aglutinación en látex.
ELISA
ELISA Tween 20.

Tomado de Suter et al 1985; Armstrong et al 1983; Bruggman et al 1977 a y b; Etheridge et al. 1979 a y b; Freeman et al 1982; Lam et al, 1971 a; Mckean, et al. 1979; Sands, et al 1982; Schuller, 1977. Slavik, 1976 y 1981; Ross 1990.

Las pruebas de ELISA y Fijación de complemento son las mas utilizadas. Actualmente se ha desarrollado la prueba de ELISA Tween 20 que reduce al mínimo las reacciones cruzadas con M. flocculare, teniendo también esta prueba amplias perspectivas para el monitoreo de hatos, particularmente en la detección de anticuerpos de calostro de cerdas (Ross, 1990). Sin embargo, a pesar de que en estas pruebas se ha observado la aparición de altos niveles de anticuerpos, éstos no confieren protección (Lam y Switzer, 1971, b; Etheridge et al 1979 a; Lloyd et al, 1984).

Con respecto a la inmunidad celular, ésta ha sido medida por las técnicas de transformación blastoide (Roberts, 1972; Kishima and Ross, 1985; Tajima, 1983), hipersensibilidad cutánea (Adegboye, 1978; Itraraksa et al 1983) encontrando una

respuesta significativa a las dos pruebas hasta por un período comprendido de 44 a 66 semanas posinoculación, así mismo se ha detectado que existe una alteración de la función del macrófago alveolar e inmunosupresión en los cerdos infectados (Ross,1990). También se han detectado anticuerpos contra las glicoproteínas de membrana de los eritrocitos de cerdo después de una infección experimental con M. hyopneumoniae, apoyando de esta forma la asociación de enfermedad autoinmune en la patogénesis de esta enfermedad (Suter et al., 1985).

Por otro lado se ha observado que los animales recuperados desarrollan una fuerte inmunidad a la enfermedad, ya que en la exposición experimental de cerdos, cuatro meses después de la primoinfección no desarrollan neumonía, en comparación con los cerdos que no tuvieron primoinfección. Sin embargo, esta inmunidad es de corta duración ya que pueden desarrollar el proceso neumónico a los 11 meses después de una infección inducida (Lam y Switzer,1971 b).

1.4 Control de la Neumonía Enzootica mediante vacunación.

La vacunación ha mostrado inducir protección en otros modelos experimentales de micoplasmosis respiratoria, así tenemos M. pneumoniae en hamsters, M. pulmonis en ratón y ratas, M. bovis en bovinos y M. gallisepticum en pollos. Los inmunógenos preparados han reducido la colonización en el pulmón de estas especies (Ross et al., 1984).

La vacunación contra M. hyopneumoniae se ha intentado por

varios investigadores, pero con resultados poco alentadores (ver Cuadro 2) pues no confiere una protección duradera, debido primordialmente a la naturaleza del micoplasma que es antigénicamente muy pobre (Flores, 1982 . Goodwin, 1982b).

Otro factor que se ha mencionado en el fracaso de la vacunación es que la membrana del micoplasma es muy parecida a las membranas de los mamíferos, lo cual la hace poco antigénica por no ser " extraña" (Pijoan et al 1986).

Whittlestone (1976) consideraba que el fracaso en la elaboración de vacunas para afecciones causadas por micoplasmas porcinos radica en la dificultad de la producción de antígeno y de encontrar un adyuvante eficaz. Sin embargo al parecer esta dificultad ha sido mejorada con la producción de bacterinas por laboratorios comerciales, dado que estos han encontrado la forma de producir masivamente el micoplasma, mediante la utilización de cepas de micoplasmas de alta reproducción y la optimización de los medios de cultivo, haciendo de esta manera económicamente rentable la venta de la bacterina.(Dayalu y Ross, 1990 : Petersen et al 1990).

A. Inmunógenos convencionales.

Los primeros trabajos realizados con una bacterina eficiente por Goodwin et al fueron con *M. hyopneumoniae* inactivado con formol. Estos autores encontraron que la inmunización de los cerdos por vía subcutánea no produjo ningún efecto considerable, en relación al crecimiento de los

CUADRO 2. EVOLUCION DE LOS INMUNOGENOS UTILIZADOS PARA LA PREVENCION DE LA NEUMONIA ENZOOTICA

ANO	AUTOR	TIPOS Y CARACTERISTICAS DEL INMUNOGENO	VIA DE INMUNIZACION	TIPO DE CERDO
A. INMUNOGENOS CONVENCIONALES				
1969	Goodwin ^a	R.h. formalizado + ACF	IN	GNOTOBIOLOGICO
1971	Lam y Switzer	R.h. tratado con: A. ether con AIF B. ether + 0.3 % de formal + AIF C. congelación y descongelación + AIF D. lauril sulfato y sulfato de amonio + AIF E. 0.3 % de formal.	IN IN IN IN	SFF SFF SFF SFF
1971	Bacterina ^a Lanasa	R. Myorhinis inactivado con formal en hidrosido de aluminio	IN	CONVENCIONAL
1973	Goodwin y ^{oo} Whittleston	R.h. formalizado en diferentes adyuvantes	IN, SC	SFF
1976	Farrington ^a	R.h. en una base oleosa	IN	SFF
1979	Slovak et. al. ^{oo}	R.h. en un adyuvante oleoso	IN	SFF
1981	Kristensen	R.h. + ACF	IN	SFF
1982	Eberhard ^{oo} Lloyd	R.h. vivo	SC, IV, IF	SFF
1984	Ross et. al.	Células completas de R.h. + AIF Extracto de R.h. + AIF Sobrenadante de cultivo + AIF Células de R.h. lavadas con solución salina + AIF	IN IN IN IN	SFF SFF SFF SFF
1985	Mishima et. al.	R.h. inactivado con ácido de sodio con dextran sulfato como adyuvante	IN	SFF
1990	Petersen et. al.	Cepa Selwyn 1002 de R.h. inactivada con un "agente especial" en adyuvante oleoso	IN	SFF CONVENCIONAL
1990	Sayasu y Ross	Célula completa de R.h. (vacuna 3NF-5) inactivada con un "agente especial" en adyuvante oleoso	IN	SFF CONVENCIONAL
B. INMUNOGENOS DE EXTRACTOS CRUDOS DE MEMBRANA^b				
1987	Kobisch et. al.	Membrana plasmática de R.h.	IN	CERDA GESTANTE
1990	Kobisch et. al.	Membrana plasmática de R.h.	IN	LECHON
C. INMUNOGENOS DE SUBUNIDADES^b				
1990	Topp y Faulds	Proteína de 74.5 Kd.	<	<
1990	Young et. al.	Proteína de 64 Kd.	<	<
1990	Oso et. al.	Proteína de 85 Kd.	<	<
1990	Strasser et. al.	Proteína de 76 Kd.	<	<

R.h.: *Mycoplasma hyopneumoniae*

^a Citado en Lam and Switzer (1971).

^{oo} Citado en Ross et al. (1984).

SFF: Libro de enfermedades respiratorias.

^a Citado en Goodwin (1982).

^b Citado en Ross (1990).

^c Dato no encontrado.

IN: Intramuscular

IN: Intranasal.

IP: Intraperitoneal.

AC: Adyuvante completo de Freund.

AIF: Adyuvante incompleto de Freund.

IV: Intravenosa.

SC: Subcutánea.

IF: Intradermal.

animales, o bien respecto a la frecuencia o intensidad con la que se presentó la neumonía; por el contrario, el uso de otra bacterina por vía intramuscular, similar a la anterior pero con una cantidad de M. hyopneumoniae mas concentrada, tuvo la limitante de que se produjeron reacciones locales muy severas debidas al adyuvante. Las bacterinas formolizadas no confirieron inmunidad significativa, aún cuando se lograron títulos elevados de anticuerpos. (Citado por Ross, 1984)

Lam y Switzer (1971, b) usaron cinco bacterinas con diverso tratamiento de inactivación (ver Cuadro 2) las cuales fueron efectivas, ya que al inocular a 56 cerdos con cualquiera de las 4 preparaciones (A, B, F, G) unicamente 13 cerdos (23.2%) presentaron lesiones neumónicas, después del desaffo intranasal con cultivos del micoplasma y en el grupo control que constó de 54 cerdos, 45 de ellos presentaron lesiones neumónicas (83.3%). Estos datos indicaron que estas bacterinas podrian ser usadas en la prevención de la micoplasmosis pulmonar porcina. Sin embargo, el aislamiento del micoplasma de los grupos inmunizados estableció que una verdadera vacuna debería prevenir la colonización del micoplasma en el pulmón. Otro aspecto que se observó es que el encontrar niveles altos de anticuerpos medidos por la prueba de hemoaglutinación indirecta, no era sinónimo de protección. Se tienen datos de una bacterina elaborada y vendida en Suiza por los laboratorios Pfizer que fue usada para la prevención de la Neumonía Enzoótica. Dicha bacterina contenía Mycoplasma hyorhinis formolizado adicionada con hidroxido de aluminio como adyuvante. De acuerdo a la

información obtenida se vendieron 10,000 dosis entre los años de 1962 y 1968. Sin embargo, no se conoce la razón del uso de M. hyorhinis, que siendo serológicamente distinto de M. hyopneumoniae, se haya usado para la prevención de la micoplasmosis pulmonar porcina (Lam and Switzer , 1971 b).

En 1976 se reportó una vacuna oleosa que proporcionó una protección del 75% (Citado en Goodwin, 1982 b).

Kristensen et al (1981) prepararon una bacterina con M. hyopneumoniae inactivada en adyuvante completo de Freund, que fue probada en lechones a los cuales se les determinó la respuesta inmune celular - humoral y el efecto protector de la inmunidad producida. La respuesta inmune celular fue medida por transformación blastoide y la humoral por la prueba de ELISA. Después de la vacunación los animales mostraron una marcada sensibilización de los linfocitos y un alto título de anticuerpos, sin embargo, cuando los animales fueron desafiados por una infección natural (fueron puestos en contacto con animales que presentaban signos de neumonía enzoótica), no se observó un efecto protector de la inmunización, ya que los resultados histopatológicos, bacteriológicos y de inmunofluorescencia entre los grupos no vacunado y vacunado no mostraron diferencias.

Etheridge y Lloyd en 1982 reportan que al utilizar una vacuna viva por vías intravenosa, subcutánea e intraperitoneal, M. hyopneumoniae fue aislado en menor frecuencia de los cerdos inmunizados (citado en Ross et al. 1984).

Se ha reportado que el dextrán sulfato (DS) aumenta la reacción de hipersensibilidad retardada para M. pulmonis en el ratón, por lo cual Kishima, Ross y Kaniyasu (1985) evaluaron el efecto de esta sustancia con células muertas de M. hyopneumoniae sobre la respuesta inmune celular y humoral. La respuesta celular fue determinada por la prueba de transformación blastoide y la respuesta humoral por la prueba de fijación de complemento. Tanto la respuesta celular como la humoral con M. hyopneumoniae con DS fueron superiores al grupo que solo recibió el micoplasma y con el que no fue inmunizado; La media de los porcentajes de lesión neumónica entre los grupos de M. hyopneumoniae mas DS, el de micoplasma solo y el sin vacuna fue de 1.21, 4.02 y 8.47% respectivamente. Por lo que en éste trabajo, la severidad de la neumonía utilizando al DS como adyuvante fue significativamente menor que con el grupo no vacunado.

Ross et al (1984) prepararon varias vacunas utilizando células completas del micoplasma, extractos de células, sobrenadante de cultivo y células lavadas con solución salina. Los resultados obtenidos de la bacterina con células completas mostró que la concentración de 10^9 unidades cambiantes de color (CCU) fue la que dió mejor protección, mostrando con esto que no se requiere de un cultivo concentrado para la producción del inmunógeno. De los sobrenadantes obtenidos por lavado de solución salina del micoplasma se observó que estos tenían actividad protectora.

Ross sugiere que esto se debió probablemente a que durante el proceso de centrifugación no se removió toda la membrana del micoplasma, probablemente contribuyendo esto a inducir protección. Las células tratadas con calor también mostraron actividad protectora, manteniéndose ésta hasta los 80 C. Los extractos no tuvieron ningún efecto protector, incluso dichos extractos incrementaron el desarrollo de lesiones.

Ross y su grupo, en conjunto con los laboratorios Smith Kline Beecham Animal Health, utilizaron dos vacunas denominadas XMHP4-1 y XMHP5, ambas contienen células completas e inactivadas de M. hyopneumoniae con un adyuvante no mencionado, difiriendo las dos por el tipo de agente inactivante utilizado. Estas dos vacunas fueron evaluadas primero en cerdos libres de enfermedades respiratorias. De las dos vacunas la denominada XMHP5 fue la que produjo una relativa protección contra la exposición intratraqueal de homogenizado pulmonar del micoplasma, ya que ésta vacuna produjo reducción en el porcentaje de lesión pulmonar, de lesión microscópica y del número de cerdos positivos a inmunofluorescencia. Al realizar una prueba con cerdos convencionales utilizando ésta vacuna y con un desafío con dos tipos de cepas de Mycoplasma hyopneumoniae se observó que el grupo control mostró una media de lesión pulmonar del 41.15% y el grupo vacunado solo el 6.8%. Confirmando con éstos datos la eficacia de ésta vacuna (Dayalu y Ross, 1990).

Los laboratorios Solvay Animal Health han elaborado una bacterina con la cepa de M. hyopneumoniae denominada cepa Solvay 1002, la cual en un estudio previo mostró ser la mejor en producir lesión pulmonar y en crecimiento "in vitro". La bacterina ésta formada por células completas de M. hyopneumoniae inactivadas mediante un "procedimiento especial".

Al comparar la eficacia de esta bacterina con una formolizada, en animales de granjas del estado de Iowa con M. hyopneumoniae confirmado, se observó que en animales vacunados con la bacterina formolizada, otros con la bacterina de Solvay y en cerdos del grupo control presentaron un porcentaje de lesión pulmonar de 26.4, 11.6 y 30.4 % respectivamente. En otras pruebas de campo realizadas se ha observado reducciones de lesión pulmonar del 60 y 67%. Cabe hacer mención que ésta bacterina ya se encuentra disponible en México. (Petersen et al., 1990).

B. Inmunógenos de extractos de membrana.

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

C. Inmunógenos de subunidades.

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

1.5 Producción de cerdos libres de micoplasmas.

La creación de este tipo de hatos es el método más efectivo para controlar la Neumonía enzoótica (Betts, 1972; Madsen, 1982). Comprende la completa despoblación, limpieza y desinfección de las unidades de cría, que se dejan usar un determinado tiempo (por lo menos 3 - 4 días) para después repoblarlas con animales libres de la enfermedad. Resulta sumamente difícil obtener animales libres de Neumonía enzoótica de las granjas, por lo que se recurre a la compra de cerdos obtenidos por cesárea y que han sido privados de de calostro, que se mantienen en áreas de aislamiento estricto (Goodwin, 1965, 1971, 1984; Minitis, 1982). A la edad de 4 a 5 semanas, se pueden destinar a las granjas los

lechones. Una vez que se restablezca la piara, quedará cerrada a toda persona ajena a la granja, fomites, etc.. Así las granjas libres de la enfermedad deberán ser observadas estrechamente para mantenerlas libres (Goodwin, 1972, 1985 b).

La forma más eficaz a corto plazo para las condiciones prevalentes en nuestro país, es la instauración de granjas libres de micoplasmas. Esto se consigue iniciando las granjas con lechones procedentes de cerdas de más de tres partos.

Dicha práctica se fundamenta en las siguientes razones:

- que dichas cerdas se curan espontáneamente y no infectan a sus camadas .
- el mantenimiento se facilita porque aún no se ha establecido que los objetos contaminados, tales como la ropa, botas, etc., intervengan en la transmisión, sino que requieren de contacto directo entre el animal infectado y el susceptible (Fahay, 1982).

1.6 Profilaxia con antibióticos.

Los medicamentos han probado ser útiles en el control de infecciones secundarias y tienen importancia en la prevención y disminución de la infección contra micoplasmas (Cuadro 3).

Los antibióticos más usados son las tetraciclinas, lincomicina y tiamulin, que han tenido efecto sobre la reducción de la severidad de las lesiones. Recientemente han sido creados dos métodos, el MEW (Medicated early weaning, destete temprano medicado) y el Isoweane, basados en el uso energético de antibióticos para prevenir la transmisión de enfermedades de la cerda al lechón.

CUADRO 3
 ANTIBIOTICOS EMPLEADOS EN EL CONTROL DE LA
 NEUMONIA ENZOOTICA

 Aminoglicósidos
 Cefalosporinas
 Nitrofuranos
 Macrolidos
 Tiamulin
 Tetraciclinas.
 Tilosina
 Lincomicina
 Enrofloxacin
 Norfloxacin

Adaptado de Burch, 1982b; Degeeter, 1982;
 Etheridge, 1979 c; Forster, 1982; Gatmeittan
 1982; Goodwin, 1985 a; Hodges, 1969; Huhn, 1982;
 Hsu, 1982; Meszaros, 1985; Patterson, 1982; Pointon, 1983
 y 1985b; Ross, 1990; Stipkovits, 1978.

Dichos métodos han probado producir hatos libres de enfermedades respiratorias incluyendo neumonía enzoótica y rinitis atrofica, utilizando los lechones de esta granja para programas de repoblación (Ross, 1990).

Sin embargo todos los medicamentos mencionados solo ayudan a reducir la severidad de la enfermedad, pero no previenen la infección pulmonar, incluso el efecto patológico es suprimido durante la administración de medicamentos, sin embargo, se pueden desarrollar lesiones típicas de micoplasma después de que los antibióticos se dejan de suministrar. Otros inconvenientes de uso de antibióticos es la elevación del costo de las raciones, así como la selección de cepas resistentes.

2. HIPOTESIS DE TRABAJO.

Existen numerosos estudios sobre la experimentación de diversas vacunas de Mycoplasma hyopneumoniae, para prevenir la neumonía enzoótica, que han sido aplicadas por diferentes vías y en cerdos libres de patógenos específicos, gnotobióticos o privados de calostro; los resultados muestran la poca efectividad en cuanto a la protección.

La hipótesis del presente trabajo, plantea que la administración de M. hyopneumoniae por vía intraperitoneal estimulará a macrófagos y a linfocitos B del tejido linfoide relacionado con intestino (TLRI, en inglés GALT de gut associated lymphoid tissue) y que, a través de la circulación linfocitaria, que se pretende denominar como circuito celular intermucosal, se estimule al tejido linfoide relacionado con los bronquios (TLRB, del inglés BALT de bronchus associated lymphoid tissue) para producir anticuerpos que serán capaces de reconocer al micoplasma en la mucosa respiratoria y evitar de esta manera la colonización del tejido pulmonar (Scicchitano et al., 1984).

Por lo cual, se plantea como objetivo principal la evaluación de dos inmunógenos, que aplicados por vía intraperitoneal sean capaces de prevenir la enfermedad en cerdos convencionales.

Resumen del Plan de Trabajo.

Para poder cumplir con el objetivo planteado se hizo lo siguiente:

1. Se produjo biomasa de M. hyopneumoniae.
2. Se preparó un adyuvante a base de Corynebacterium ovis y se determinó su inocuidad en conejos y cerdos.
3. Se prepararon dos inmunógenos de M. hyopneumoniae, uno a partir de células completas, inactivado con formaldehído y suspendido en adyuvante y otro de células completas sin adyuvante.
4. Se vacunaron cerdos convencionales por vía intraperitoneal.
5. Se evaluaron los inmunógenos mediante el desafío a cerdos vacunados y no vacunados, midiendo los siguientes parámetros:
 - a) Signos clínicos respiratorios y temperatura.
 - b) Lesiones pulmonares macroscópicas y microscópicas.
 - c) Recuperación de M. hyopneumoniae.

3. MATERIALES Y METODOS.

3.1. MATERIALES.

3.1.1. Preparación del inmunógeno.

3.1.1.1 Producción de M. hyopneumoniae.

Se utilizó la cepa 194 de M. hyopneumoniae obtenida a partir de un homogenizado pulmonar, libre de virus (donada por el Dr. Ross, Universidad del estado de Iowa, E.U.).

3.1.1.2 Producción del adyuvante.

Para la producción del adyuvante se empleó una cepa de Corynebacterium ovis. de la colección de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, U.N.A.M., aislada a partir de una muestra de linfadenitis caseosa. Aceite mineral (Sigma Chemical), Tween 80 (Sigma Chemical) y solución amortiguada de fosfatos (PBS) de pH 7.2

3.1.2 Prueba de inocuidad del adyuvante.

Se utilizaron dos lechones de raza Yorkshire destetados a la quinta semana, provenientes de madres de quinto parto procedentes de una granja sin antecedente de micoplasmosis pulmonar, a los cuales se les alimentó con "Lechoncina" libre de antibióticos de uso terapéutico. Así mismo se emplearon cinco conejos de 2 kg de peso, raza Nueva Zelanda, alimentados con "Conejina". Ambos productos fueron de Purina de Mexico.

3.1.3 Grupos experimentales.

Se utilizaron 12 lechones, raza Yorkshire, destetados a la quinta semana, provenientes de madres de quinto parto, de tres diferentes camadas, procedentes de una granja sin antecedentes de micoplasmosis porcina.. Estos animales fueron alimentados con "Lechoncina" libre de antibióticos de uso terapéutico. (Purina de México).

3.1.4 Histopatología.

Se utilizó una solución de formalina amortiguada al 10% para fijar todas las muestras que se colectaron.

3.1.5. Cultivo y aislamiento de microorganismos.

3.1.5.1. Medios de cultivo para micoplasmas (Friis, 1969, 1971 a y b, 1977):

Medio HP "Hypopneumoniae" modificado por Friis.

Solución salina balanceada modificada de Hanks	152 ml
Extracto de levadura estéril	18 ml
Agua destilada	225 ml
Infusión cerebro corazón (Difco)	2.5 gr
PPLO Caldo (Difco)	2.5 gr
Rojo de Fenol (0.22%)	3.5 ml
Bacitracina	75 mg
Meticilina	75 mg
Suero inactivado de cerdos	100 ml

Medios basales : PPLO w/o CV (Difco Laboratories No. 0554-01), Infusión cerebro corazón (Difco Laboratories No. 0037-02).

Solución salina balanceada de Hanks.

Agregar en el orden descrito :

Solución Stock "A"	NaCl	80 gr.
	KCl	4.0 gr.
	MgSO \cdot 7H O	1.0 gr.
	4 2	
	MgCl \cdot 6H O	1.0 gr.
	2 2	
	Agua destilada hasta	400 ml
	CaCl	1.4 gr
	2	
	Agua destilada hasta	500 ml.

Solución Stock B :

	NaH PO \cdot 12 H O	1.5 gr
	2 4 2	
	Agua destilada	400 ml.
	KH PO	0.6 gr.
	2 4	
	Agua destilada	500 ml.

Al momento de su uso, 25 ml de la Sol. "A" se mezclan con agua destilada (hasta 400 ml), después se agregan 25 ml. de la Sol. "B" y se completa con agua destilada hasta 500 ml. El medio de Friis se ajustó con NaOH 1 N a un pH de 7.6. El extracto de levadura y el suero se esterilizaron por filtración y fueron adicionados junto con los antibióticos a los medios previamente esterilizados en autoclave a 121 C 15 lb/pulg , durante 15 min.. Los medios se distribuyeron en tubos estériles (13 x 100 mm) con tapón de baquelita, conteniendo 4 ml. cada tubo. Para la preparación de medios

sólidos se utilizó la misma base de medios líquidos, pero se adicionó agar noble a una concentración de 10 gr para un litro de medio líquido.

Extracto de levaduras.

Se suspendieron 50 gr de levadura fresca de panadería en 100 ml de KH PO_4 0.2 M. Se calentó a 80 - 85 C durante 20 minutos, se clarificó mediante filtración con cartuchos Millipore "Lifegard" CP-15 y se ajustó el pH a 7.6 con una solución 1 N. de NaOH. Se esterilizó por filtración (membranas de Millipore 0.22 micras) y se almacenó a -20 C hasta su uso.

3.1.5.2 Medios de cultivo para Corinebacterias.

Se empleó caldo infusión cerebro corazón (BHI, Bioxon de México) suplementado con suero de equino al 10 %, utilizándose el mismo con agar al 1.5 % para la preparación de medio sólido.

3.1.5.3 Medios de cultivo para Pasteurelas.

Se utilizó Base de agar sangre (Bioxon de México) adicionado con sangre de bovino al 5%.

3.1.5.4 Medios de cultivo para Bordetelas.

Se utilizaron Base de agar sangre con 5% de sangre de bovino y Mac Conkey (Bioxon de México).

3.1.6. Medios y pruebas de diferenciación bioquímica para micoplasmas.

3.1.6.1 Micoplasmas.

3.1.6.1.1 Medio de hidrólisis de la arginina.

PPLO Caldo (Difco)	10.5 gr
L- arginina HCl	5.0 gr
Rojo de fenol (Sol. 0.2%)	6.25 ml
Agua destilada hasta	250.00 ml

Se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 1 N, se esterilizó por filtración y se agregaron asépticamente los siguientes compuestos estériles :

Suero de equino	100.00 ml
Extracto de levadura	50.00 ml
Penicilina G potásica	250000 UI

3.1.6.1.2. Medio de glucosa

Se utilizaron como base los medios de Eaton y Friis con glucosa a razón de 1 gr por 1000 ml de medio. Se ajustó el pH a 7.0 y posteriormente se agregaron en forma aséptica los componentes estériles siguientes:

Suero de equino	200 ml
Extracto de levadura	100 ml
Penicilina G sódica	500000 UI

Los dos medios anteriores fueron distribuidos en tubos de 13 x 100 con tapón de baquelita conteniendo 4.5 ml cada tubo y se almacenaron a 4 C.

3.1.6.1.3. Prueba de dependencia de esteroides.

Se prepararon soluciones de polianeto sulfonato de sodio (Liquoid Roche) al 5 % y digitonina al 1.5 %.

Se esterilizaron por filtración. Una gota de Liquoid o digitonina, se colocó sobre discos de papel filtro estériles, se secaron a 37 C y se almacenaron a 4 C.

3.1.6.1.4 Prueba de producción de peróxido de hidrógeno .

Se preparó una solución al 0.1% de azul de metileno en agua destilada, se esterilizó en autoclave y se almacenó a 4 C. Así mismo se emplearon glóbulos rojos tipo "O" de humano .

3.1.6.2 Pasteurelas y Bordetelas.

Se realizaron las pruebas bioquímicas de identificación en base a lo recomendado por Cowan y Steel (1974).

3.1.7 Prueba de Inmunofluorescencia.

3.1.7.1 Antisuero contra M. hyopneumoniae.

El antisuero empleado para la prueba de inmunofluorescencia indirecta fue proporcionado amablemente por el Dr. Ross del Veterinary Medical Research Institute, College of Veterinary Medicine, Iowa State University, proveniente de conejo, utilizándose a una dilución de 1 : 20 al momento de su uso.

3.1.7.2 Conjugado de antigamaglobulina de conejos preparado en cabras.

Se empleó un suero comercial (Laboratorios Hoescht), antigamaglobulina de conejo preparado en cabras, marcado con

fluoresceína a una dilución 1:30 al momento de su uso.

3.1.7.3 Soluciones.

- Solución 0.01 M amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2 :

Solución A	:	NaH ₂ PO ₄	
		NaCl	8.5 gr
		Agua destilada	1000 ml
Solución B	:	Na ₂ HPO ₄	1.42 gr
		NaCl	8.5 gr
		Agua destilada	1000 ml

Se mezclan 280 ml de la Sol. A con 720 ml de la Sol. B.

Ajustar el pH si es necesario.

- Glicerina.
- Etanol absoluto.

3.1.7.4 Equipo.

Microscopio de fluorescencia y crióstato.

Se utilizó un microscopio binocular Carl Zeiss WL equipado con condensador de campo oscuro y lámpara de vapor de mercurio HB 200 W/4. Al momento de su utilización se usaron un filtro de excitación azul (BG 12) y un filtro de barrera 50. El crióstato utilizado fue un American Optical.

3.2 METODOS.

3.2.1. Preparación del inmunógeno de M. hyopneumoniae.

3.2.1.1 Producción de M. hyopneumoniae

El micoplasma se aisló a partir del homogenizado pulmonar y para determinar el tiempo óptimo de cosecha del micoplasma se realizó una medición de la absorbancia (densidad óptica) a un cultivo del micoplasma. Para ello se emplearon 2 tubos con 10 ml de medio de Friis inoculados con 10 microlitros del micoplasma. Otro tubo no se inoculó el cual fue considerado como el control. Todos los tubos carecían de indicador rojo de fenol para evitar falsas lecturas. Uno de los tubos inoculados se mantuvo en estufa bacteriológica en reposo, el otro tubo se colocó en un baño metabólico en agitación a 50 rpm. Todos los tubos se incubaron a 37 C y cada 24 horas durante cinco días se les realizó la determinación de absorbancia mediante el uso de un espectrofotómetro Coleman Junior II A, realizando la lectura a 625 nm. Después de determinar el tiempo óptimo de cosecha se reprodujo en forma masiva mediante subcultivos sucesivos hasta la obtención de una cantidad de aproximadamente 10 ml de biomasa. La cepa fue cultivada en 10 ml. de medio de Friis, incubada 24 hrs. y posteriormente se inoculó en 500 ml. del medio mencionado, incubándose con rotación (37 C a 50 rpm). Las células fueron cosechadas por centrifugación a 16,000 xg y se lavaron en solución salina balanceada de Hanks (HBSS) a 16,000 xg. Después se tomó una alícuota para determinar la concentración de organismos viables en unidades cambiantes de color (CCU), la cual se realiza haciendo una

dilución 1:10 del micoplasma en medio líquido de Friis, a partir de la cual se realizan una serie de diluciones decimales (10⁻¹) en medio líquido de Friis, se incuban a 37 C hasta por un período de cuatro semanas. El último tubo o dilución que muestre un cambio de color ácido visible se considera el título que corresponde a las unidades cambiantes de color (UCC).

El remanente de la suspensión fué tratado con formalina (0.15%, J.T. Baker) toda la noche y posteriormente se hicieron lavados con HBSS. Después de la determinación de las CCU, las bacterinas fueron diluidas para obtener las dosis adecuadas de 10⁹ UCC por mililitro.

3.2.1.2 Producción del adyuvante.

Corynebacterium ovis fue sometido a un proceso similar al del micoplasma, sembrándose en medio de BHI adicionado con suero, realizándose la determinación de la absorbancia sólo en condiciones de agitación, a 50 rpm y a 37 C. Las lecturas se realizaron a 660 nm, cada 3 horas hasta a completar 24 hr. Se centrifugó y lavó en forma similar al micoplasma y el paquete celular se rompió utilizando una bomba de ruptura con nitrógeno a 1000 PSI por 15 minutos, durante tres veces y posteriormente se realizó tinción de Gram y siembra en medios de cultivo (agar sangre, BHI y Mac Conkey) para determinar su pureza. Posteriormente se mezcló de la siguiente forma: Aceite mineral, PBS, C. ovis, Tween 80, en una relación 2:1:1:1 respectivamente.

3.2.1.3 Preparación del inmunógeno con el adyuvante.

El micoplasma con un título de 10^9 UCC/ ml y el adyuvante fueron mezclados en una proporción 1:1 (v/v) . Se conservó en refrigeración a 4 C por un lapso de tiempo de aproximadamente 40 días hasta su uso.

3.2.1.4 Prueba de inocuidad del adyuvante.

Se realizó mediante la inoculación en dos especies animales (5 conejos y 2 cerdos). El adyuvante se inoculó por vía intraperitoneal y los animales se sacrificaron a los 25 días para observar efectos patológicos.

3.2.2 Producción del homogenizado pulmonar con M. hyopneumoniae cepa 194 para el desafío.

Se inocularon cuatro lechones en dos pases, utilizándose dos lechones en cada pase. A los dos primeros se les inoculó con la suspensión de M. hyopneumoniae cepa 194 (con un título de 10^4 UFC/ ml) usando 20 ml. por animal. Se administró por vía endotraqueal con una sonda nasofaríngea, para lo cual los cerdos fueron previamente sedados con asaperona (2 mg / kg de peso, vía intramuscular) y anestesiados con clorhidrato de metomidato (1.5 mg/ kg de peso, vía intravenosa). Los lechones fueron observados diariamente y se sacrificaron por choque eléctrico y exsanguinación cuando presentaron los signos clínicos de neumonía (aproximadamente al día 20 posinoculación). Se obtuvieron asépticamente los pulmones y de sus áreas neumónicas se preparó un homogenizado pulmonar al 10% (p/v)

en medio de Friis con morteros Ten- Broeck. Con éste homogenizado se inocularon los cerdos experimentales de la manera antes descrita.

Del último pase se tituló el homogenizado empleándose muestras de 0.5 ml. que se diluyeron seriadamente en medio de Friis, se incubaron, se aislaron y los micoplasmas aislados se identificaron.

3.2.3 Grupos experimentales.

Se formaron tres grupos experimentales de cuatro cerdos cada uno, los cuales se distribuyeron en áreas separadas, con comederos y bebederos independientes. Antes de realizar el experimento se mantuvieron una semana en reposo. Los grupos se formaron de la siguiente manera: Grupo I (testigo), inoculados intraperitonealmente (I/P) con 2.0 ml. de medio de Friis líquido, Grupo II, inoculados I/P con 2.0 ml de una bacterina de M. hyopneumoniae a base de células muertas y completas (10⁹ UCC/ ml) sin adyuvante y Grupo III, inoculado I/P con 2.0 ml. de una bacterina de M. hyopneumoniae a base de células muertas y completas (10⁹ UCC/ ml) en adyuvante oleoso y Corynebacterium ovis. La inoculación de la vacuna se realizó con una jeringa y embolo de cristal, debido a que se garantiza que el inóculo penetra adecuadamente a la cavidad peritoneal, ya que no ofrece ninguna resistencia cuando se está inyectando, lo que no ocurre al usar jeringas de plástico.

Todos los cerdos se desafiaron con 20 ml. del homogenizado pulmonar conteniendo M. hyopneumoniae cepa 194 por vía intratraqueal, el día 28 posvacunación. Los cerdos se sacrificaron el día 50 posvacunación (32 días posdesafío).

3.2.4 Temperatura corporal y signos respiratorios.

A todos los cerdos diariamente se les tomó la temperatura por vía rectal entre las 8 y las 9 de la mañana durante todo el experimento. Se observaron también los signos clínicos respiratorios de tos y disnea. El sacrificio de todos los animales se realizó cuando en los cerdos del Grupo I (control) se observaron los signos respiratorios severos.

3.2.5 Evaluación de las lesiones macroscópicas.

Se midió la extensión de las lesiones mediante la técnica de planimetría, en donde se comparan con diagramas pulmonares normales, tanto de vista dorsal como ventral. Para ello se observó el pulmón del cerdo por sus dos vistas y se dibujaron en los diagramas las áreas afectadas, señalando la presencia de adherencias y aspecto de las lesiones. Posteriormente se superpuso al diagrama realizado uno normal del pulmón cuadrículado en acetato, y se contó el número de espacios del cuadrículado que representó cada lesión. Se calculó el promedio del área ocupada por las lesiones neumónicas tomando como base el porcentaje del área total del pulmón. (Ciprián, 1988).

3.2.6. Histopatología.

Pequeños fragmentos representativos de los pulmones (lóbulo craneal y cardíaco derechos) se fijaron en formalina al 10%, se incluyeron en parafina para la obtención de cortes de 6 micras de espesor tratándose con la tinción de hematoxilina - eosina (H.E.).

3.2.7. Cultivo y aislamiento de microorganismos.

3.2.7.1 Aislamiento de M. hyopneumoniae. (Armstrong, 1981; Boughton, 1975; Ciprián, 1978; Kobisch, 1982)

Para realizar el aislamiento, se siguieron los pasos que se describen en el diagrama del cuadro 4.

3.2.7.1.1 Prueba de dependencia de esteroides.

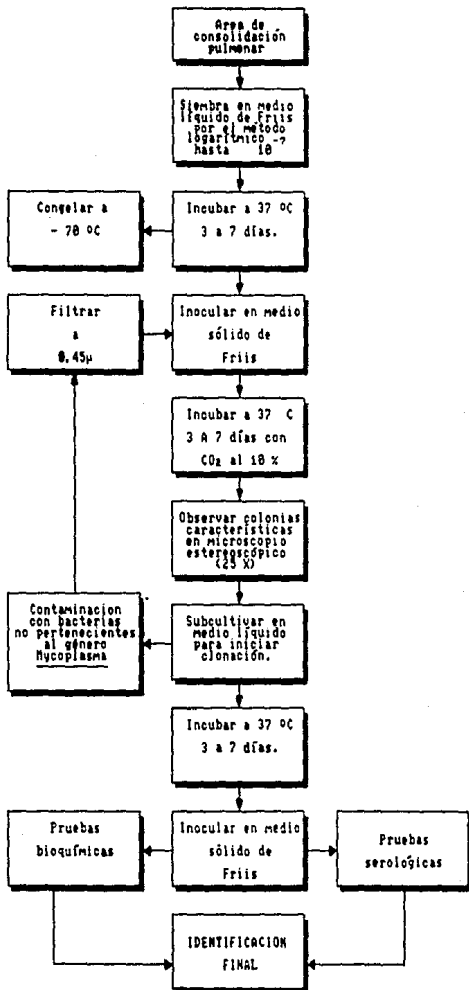
Se sembraron los micoplasmas aislados y desarrollados en medio sólido de Friis, inmediatamente se colocó sobre la superficie un sensidisco impregnado con digitonina o Liquidoid y se incubó 3 a 4 días a 37 C. Una zona de inhibición indicó la dependencia de esteroides.

3.2.7.1.2 Prueba de hidrólisis de la arginina.

Los micoplasmas aislados se sembraron en el medio líquido de arginina y se incubó a 37 C durante 3 a 4 días. Una reacción alcalina (color púrpura) se da como positiva a la hidrólisis.

3.2.7.1.3 Prueba de fermentación de la glucosa.

Los micoplasmas se sembraron en los medios de Friis líquido con glucosa y se incubaron de 3 a 4 días a 37 C. Un



cambio del medio a amarillo indica una reacción positiva.

3.2.7.1.4 Prueba de producción de peróxido de hidrógeno.

De los micoplasmas aislados y desarrollados en medio sólido de Friis, se cortaron trozos de agar de 1 cm con colonias y se colocaron en portaobjetos. También se prepararon eritrocitos (tipo "O" humano) que se lavaron tres veces con solución salina amortiguada, de esta mezcla se agregaron dos gotas sobre el agar con colonias y al cabo de unos minutos se observaron al microscopio. Una reacción positiva se manifestó al teñirse los eritrocitos de color azul, rodeando a las colonias de micoplasmas.

3.2.7.2 Aislamiento e identificación de otras bacterias.

De las lesiones neumónicas se tomaron en forma aséptica trozos de aproximadamente 1 cm³ los cuales se homogenizaron en un triturador de tejidos Ten-Broeck. Se inocularon sobre placas de gelosa sangre (sangre de bovino al 5%) y se incubaron a 37 C durante 24 a 48 horas. A las colonias purificadas se les hicieron pruebas de identificación bioquímica según Cowan y Steel (1974). Se limpió la zona de la nariz y se tomó la muestra con un hisopo estéril, se colocó en un tubo con caldo nutritivo como medio de transporte. Se sembraron las muestras en agar Mc Conkey al 1% de glucosa y en agar sangre. Las colonias purificadas se sometieron a las pruebas bioquímicas de acuerdo a Cowan y Steel(1974) para su identificación.

3.2.8 Prueba de inmunofluorescencia indirecta

3.2.8.1 Controles.

Previa la realización de la prueba se establecieron los controles con el fin de eliminar fluorescencia inespecífica. Se utilizó el antisuero contra M. hyopneumoniae y el conjugado a una dilución de 1:20 y 1:30 respectivamente, los cuales fueron puestos en contacto con un pulmón fetal normal y un pulmón de un cerdo de 6 meses de edad normales y después se realizó lo mismo sustituyendo el antisuero con un suero normal de conejo. En todos los casos fue negativa la observación de fluorescencia específica. (Erno, 1977, Kobisch, 1984).

3.2.8.2 Preparación de las muestras.

La parte afectada de las muestras congeladas se cortó, en aproximadamente 1 cm ³, procurando incluir bronquios y bronquiolos. Se hizo lo mismo para el pulmón fetal y con el pulmón normal de un cerdo de 6 meses de edad aparentemente sano. Se realizaron cortes de 8 micras con el crióstato a -20 C y se colocaron en un portaobjetos de acuerdo al protocolo establecido, posteriormente fueron fijadas en etanol absoluto, un lapso de 10 minutos.

3.2.8.3 Técnica de inmunofluorescencia indirecta.

1. Se colocó el antisuero de M. hyopneumoniae a cada una de las preparaciones.
2. Se colocaron las laminillas en cámara húmeda y se incubaron a 37 C durante 30 minutos.

3. Se lavaron en P.B.S. durante 10 minutos.
4. Se lavaron en agua destilada durante 5 minutos.
5. Se dejaron secar a temperatura ambiente.
6. Se colocó anti-gamaglobulina de conejo en cabra conjugada con fluoresceína.
7. Se colocaron las laminillas en cámara húmeda a 37 C durante 30 minutos.
8. Se lavó con agua destilada durante 5 minutos.
9. Se secó a temperatura ambiente.
10. Se colocó una gota de glicerina a cada muestra y se le colocó un cubreobjetos .
11. Se observó en microscopio de inmunofluorescencia.

4. RESULTADOS

4.1 Cultivo de M. hyopneumoniae.

La producción del micoplasma utilizado como antígeno se realizó en dos condiciones de crecimiento, en reposo y en agitación. En reposo se tomó como parámetro máximo el valor de 0.05 de absorbancia a 625 nm, obtenido al tercer día de incubación y para las condiciones de agitación se eligió el de 0.06 de absorbancia al cuarto día. En base a estos resultados los cultivos de 500 ml se incubaron en agitación a 50 rpm, a 37 C. por un período de 4 días (Cuadro 5).

4.2 Preparación del inmunógeno.

4.2.1. Preparación del antígeno de M. hyopneumoniae

Los cultivos que presentaron una lectura de absorbancia de 0.06 fueron empleados para la preparación del inmunógeno. Durante la elaboración, por cada litro de medio de cultivo se obtuvo aproximadamente 1 ml de biomasa, determinándose una concentración de organismos viables equivalente a 10^{10} unidades cambiantes de color (UCC). Se prepararon 10 ml de antígeno. Las pruebas de control de pureza revelaron que el cultivo mostró homogeneidad y además no se encontraron contaminantes.

4.2.2 Preparación del adyuvante.

La medición de la absorbancia en condiciones de agitación para la cosecha del C. ovis, se estableció en un tiempo óptimo de 18 hrs, ya que se determinó el valor mayor de absorbancia de 0.79 (Cuadro 6). Posterior a la destrucción celular se apreció un 90 % de ruptura mediante la tinción de

Gram. La combinación del C. ovis, el aceite mineral, el Tween 80 y el micoplasma permaneció homogénea hasta el momento de su uso. Se conservaron muestras del inmunógeno preparado hasta por dos meses mas después de terminado el experimento, tiempo en el cual no se observó ningún cambio en homogeneidad y apariencia.

4.2.3 Prueba de inocuidad.

La prueba de inocuidad del adyuvante se practicó en los conejos y en uno de los cerdos, ambos inoculados por vía intraperitoneal; no se observó algún signo clínico o algún cambio macroscópico aparente en el peritoneo u otros órganos (Figura 1).

Uno de los cerdos fue inoculado por error en tejido subcutáneo, presentó fiebre (40-42 C) durante los primeros cinco días, así como postración, anorexia y una fuerte inflamación en el lugar de la inoculación en los primeros 10 días. El animal fue sacrificado a los 25 días y se le hizo la necropsia; el tejido subcutáneo de la región abdominal ventral izquierda presentaba una masa de tejido de aproximadamente 3 cms. de diámetro, que al corte presentó una consistencia dura de la cual no se aislaron bacterias (Figuras 2 y 3). No se encontraron cambios patológicos aparentes en otros órganos y tejidos del animal. Histopatológicamente el granuloma subcutáneo presentaba grandes gotas liposolubles e indigeribles en el interior, así como células gigantes y mononucleares (Figura 4).

CUADRO 5.- LECTURAS DE ABSORBANCIA A DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACION DEL CULTIVO DE Mycoplasma hyopneumoniae.

DIA	CONTROL [*]	CONDICION DEL CULTIVO	
		REPOSO ^{**}	AGITACION ^{**}
0	0.010	0.010	0.010
1	0.015	0.010	0.020
2	0.010	0.015	0.030
3	0.010	0.050	0.050
4	0.010	0.050	0.060
5	0.010	0.060	0.060

* Se utilizó medio de Friis, sin indicador rojo de fenol sin inóculo.

** Se empleó 10 ml. de medio de Friis sin rojo de fenol, inoculando con 10 μ l de micoplasma. Se determinó la densidad óptica a $\lambda = 625$ nm.

CUADRO 6.- LECTURAS DE ABSORBANCIA A DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACION DEL CULTIVO DE Corynebacterium ovis.

TIEMPO	CONTROL [*]	CONDICIONES DEL CULTIVO
		AGITACION ^{**}
0	0.020	0.06
3	0.020	0.56
6	0.020	0.64
9	0.020	0.72
12	0.020	0.76
15	0.020	0.77
18	0.020	0.79
21	0.020	0.79
24	0.020	0.79

* Se utilizó medio BHI con 10 % de suero de equino.

** Se empleó un matraz nefelométrico con 250 ml. de medio BHI con 10 % de suero equino inoculado con 10 ml. de la corinebacteria.

Se determinó la densidad óptica a $\lambda = 660$ nm.



FIG.1. Peritoneo sin cambios patológicos aparentes en el cerdo que fue empleado para la prueba de inocuidad del adyuvante.



FIG.2. Granuloma en tejido subcutáneo localizado en la región abdominal en un cerdo inoculado con adyuvante, el cual no penetró en cavidad peritoneal.



FIG.3. Aspecto del granuloma al corte encontrado en el cerdo inoculado con adyuvante solo, que no penetró a la cavidad peritoneal.

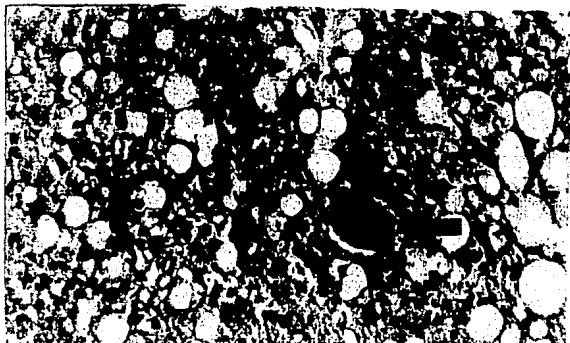


FIG.4. Reacción inflamatoria localizada en el sitio del tejido subcutáneo, en donde fue aplicado el adyuvante. Se aprecian gotas liposolubles (→), células mononucleares () y células gigantes (←).

4.3. Vacunación de los grupos experimentales.

4.3.1. Evolución de los signos clínicos en los cerdos de los grupos inoculados.

4.3.1.1. Temperatura.

Los animales del grupo I mostraron temperaturas dentro del rango normal, con promedios de 39.0 ± 0.4 durante los días posteriores a la inoculación del medio de Friis. Después del desafío mostraron hipertermia los últimos días del experimento, a partir del día 47 (20 días después), hasta el día del sacrificio.

Los cerdos del grupo II presentaron hipertermia en forma irregular posterior al día de la vacunación y fueron los días : 4, 5, 7, 8, 18, 19, 20, y 24. Los días 7 y 29 posterior al desafío fueron las temperaturas más altas con 39.7 C. El resto del experimento hasta el sacrificio se mantuvo dentro del promedio de temperatura del grupo I.

Los cerdos del grupo III mostraron hipertermia durante los siguientes días 4, 5, 7 y 17, siendo los días 17 y 32 los más altos con 39.7 C, manteniéndose dentro del promedio normal hasta el último día del experimento.

4.3.1.2 Signos respiratorios.

4.3.1.2.1 Tos.

Después del desafío en el grupo I, uno de los cerdos inició con una tos leve el día 17 continuando así hasta el día 20, a partir del cual fue moderada y en los dos últimos días del experimento dicha tos fue severa. Otro de ellos tuvo una tos moderada durante los días 20 y 21

postdesafío. En el grupo II, dos animales presentaron tos, en uno de ellos fue leve los días 20 y 21. En el grupo III sólo un cerdo presentó tos leve a partir del día 21 hasta el sacrificio.

4.3.1.2.2. Disnea.

Posterior al desafío dos cerdos del grupo I desarrollaron disnea, a uno de ellos se le detectó a partir del día 20, siendo ésta en reposo. Otro animal el día 21 mostró disnea en reposo hasta el día del sacrificio. En el grupo II dos cerdos tuvieron una disnea de esfuerzo un solo día, uno el día 20 y otro el día 21. En un tercer cerdo se detectó disnea en reposo el día 21 y prosiguió con ella hasta el día del sacrificio.

En el grupo III solo un cerdo presentó disnea, de esfuerzo de los días 21 a 23 y se mantuvo en reposo el último día del experimento.

4.4. Lesiones macroscópicas.

Los cerdos del grupo I fueron los que presentaron mayor porcentaje de lesiones, encontrándose áreas resolutivas de cicatrización, disminución de tamaño del lóbulo afectado y pocas zonas rojizas o gris rojizas. El promedio de la superficie pulmonar afectada fue de 13%.

En los animales del grupo II se observaron pocas lesiones consolidadas que abarcaron en promedio 3% de la superficie pulmonar. En el grupo III se observó el mismo fenómeno de cicatrización y acortamiento del tamaño de los

lóbulos. El del tamaño área afectada en promedio fue de 6 % (Figura 5). La distribución de lesiones macroscópicas se observa en el Cuadro 7 y en las Figuras 6a ,6b y 7.

Algunos de los cerdos presentaron lesiones de diversa magnitud en cornetes nasales, que variaron desde una ligera hasta una completa destrucción de los cornetes, con deformación nasal visible.




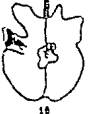












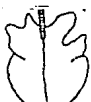



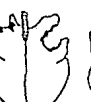



4.5 Lesiones microscópicas.

En todos los grupos ensayados en por lo menos en un animal de cada grupo se encontraron lesiones caracterizadas por una infiltración linfocitaria. Sólo en un cerdo del grupo II se encontró la presencia de polimorfonucleares.

4.6 Microorganismos recuperados.

Los aislamientos de los microorganismos se muestran en el Cuadro 8. El aislamiento de M. hyopneumoniae (Figura 8) sólo se logró de un animal del grupo I, uno del II y de dos del III. El estudio de bacteriología general reveló que por lo menos en un cerdo de cada grupo se aislaba P. multocida. Así mismo de las lesiones encontradas en cornetes nasales se aislaron B. bronchiseptica y P. multocida.

FIG. 5.- PROMEDIO Y LESIONES ENCONTRADAS EN LOS CERDOS DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES.

GRUPO	LESIONES ENCONTRADAS				± PROMEDIO
I CONTROL VISTA DORSAL VISTA VENTRAL ± DE LESION	 	 	 	 	0 10 18 20 13.5
II H. hyp. SIN ADYUVANTE ± DE LESION	 	 	 	 	10 0 0 1 3.0
III H. hyp. CON ADYUVANTE ± DE LESION	 	 	 	 	0 12 12 0 6.0

**CUADRO No. 7. - DISTRIBUCION DE LAS LESIONES
MACROSCOPICAS EN LOS LOBULOS
PULMONARES.***

Lóbulos afectados	GRUPOS EXPERIMENTALES		
	I	II	III
Apical derecho	4/4	1/4	2/4
Apical izquierdo	2/4	0/4	2/4
Cardíaco derecho	3/4	1/4	2/4
Cardíaco izquierdo	2/4	1/4	2/4
Diafragmático derecho	1/4	2/4	0/4
Diafragmático izquierdo	2/4	1/4	0/4
Accesorio	1/4	0/4	0/4

* Los datos indican el número de animales afectados en cada grupo.



FIG.6 a y b. Áreas resolutorias típicas de casos de Neumonía Enzootica encontradas en los lóbulos anteriores de algunos cerdos inoculados con Mycoplasma hyopneumoniae.



FIG.7. Lesión de consolidación rosa en el lobulo cardíaco derecho de un cerdo inoculado con Mycoplasma hyopneumoniae.

CUADRO No. 8 - MICROORGANISMOS PRESENTES EN EL PULMON
Y CORNETES NASALES DE LOS CERDOS
POSDESAFIADOS

	PULMON				CORNETES NASALES	
	No.	M.h.	P.m.	IF.	B.b.	P.m.
Grupo I CONTROL	121	-	-	+	+	-
	123	-	-	+	+	-
	126	$+(10^{-5})_a$	-	+	+	-
	131	-	+	+	-	-
Grupo II M.h. sin ADYUVANTE	122	$+(10^{-5})_a$	-	+	-	-
	128	-	+	+	-	+
	125	-	-	-	+	-
	130	-	-	+	-	-
Grupo III M.h. con ADYUVANTE	124	-	+	+	-	+
	127	$+(10^{-5})_a$	+	-	+	+
	129	$+(10^4)_a$	-	-	+	-
	s/n	-	-	+	-	-

M.h. : M. hyopneumoniae P.m. : P. multocida

B.b. : B. bronchiseptica a : Unidades cambiantes de color (UCC)

IF : Prueba de inmunofluorescencia indirecta para M. hyopneumoniae.

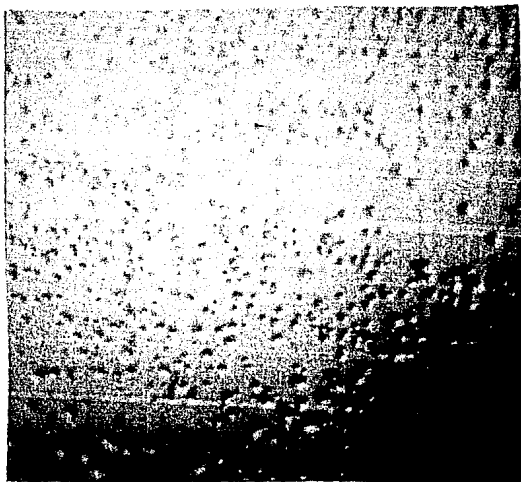


FIG.8. Colonias de Mycoplasma hyopneumoniae aisladas a partir de los pulmones neumónicos (40 X).

4.7. Identificación de M. hyopneumoniae por inmunofluorescencia indirecta.

Se detectó la presencia de M. hyopneumoniae por la prueba de inmunofluorescencia, en todos los animales del grupo I, en tres del grupo II y dos del grupo III (Cuadro 8; Figuras 9, 10 y 11).

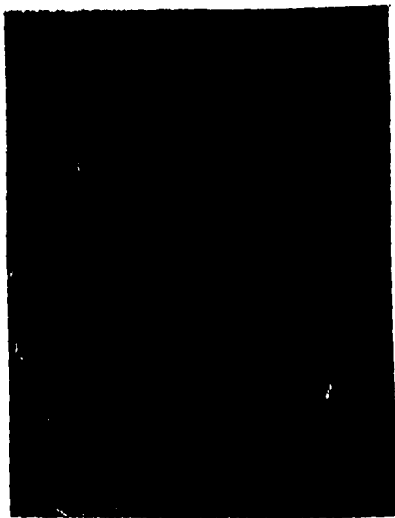


FIG.9. Sección de pulmón fetal tomado como control negativo (32 X).



FIG.10. Sección de pulmón neumónico positivo a la prueba de inmunofluorescencia indirecta, en la que se aprecian colonias de Mycoplasma hyopneumoniae (◊), sobre la superficie del epitelio ciliado (100 X).



FIG.11. Sección de pulmón neumónico positivo a la prueba de inmunofluorescencia indirecta, en la que se muestra sobre el epitelio ciliado colonias de Mycoplasma hyopneumoniae (◊), (400 X).

DISCUSION.

Durante muchos años se ha intentado el control de la neumonía enzoótica con el empleo de diversas vacunas experimentales de Mycoplasma hyopneumoniae a base de células completas vivas, inactivadas, fraccionadas, o con extractos celulares en distintos adyuvantes (Dayalu y Ross, 1990; Goodwin and Whittlestone, 1973; Goodwin, 1985 b; Petersen et al., 1990; Ross et al., 1984; Ross, 1990).

En este trabajo se evaluaron dos inmunógenos, uno a base de células completas de M. hyopneumoniae en un adyuvante oleoso, compuesto además de restos celulares de C. ovis y otro sólo con células completas de M. hyopneumoniae, sin adyuvante. Ambos fueron inoculados por la vía intraperitoneal a cerdos convencionales.

El cultivo de M. hyopneumoniae en medio de Friis en condiciones de reposo alcanzó su mayor crecimiento entre los 3 y 4 días, mientras que en agitación la producción fue ligeramente mayor al cuarto día. Estos datos muestran que el crecimiento, independientemente de las condiciones del cultivo, fue muy pobre, lo cual concuerda con Stipkovits et al. (1974), quienes también observaron rendimientos de M. hyopneumoniae muy pobres y lentos con respecto a otros micoplasmas y acholeplasma del cerdo.

En este trabajo sólo se utilizaron células completas y lavadas de M. hyopneumoniae, y no se empleó el sobrenadante. A este respecto Ross et al. (1984) han utilizado el

sobrenadante de cultivos de M. hyopneumoniae con resultados alentadores ya que producen protección en los cerdos, lo que probablemente indique que existan mayor número de factores desconocidos en el sobrenadante que inducen protección y que no se contemplaron en la elaboración de las bacterinas que se realizaron en este trabajo.

La utilización de restos de pared celular de C. parvum como adyuvante, esta reconocida por sus características inmunopotenciadoras (Osebold, 1982). La elección de C. ovis como parte del adyuvante, se debió entre otras razones, a que al igual que C. parvum tiene en su pared celular los mismos ácidos corynemicólicos (Muckle y Gyles, 1983), sin embargo no se ensayó previamente la capacidad inmunopotenciadora, pero sí se observó que es fácil producir éste microorganismo. En este trabajo la producción de C. ovis fue de alto rendimiento y de fácil manejo.

Las pruebas de inocuidad del adyuvante oleoso (C. ovis, aceite mineral, Tween 80 y agua), realizado por vía intraperitoneal al conejo y al cerdo, no produjeron cambios o signos clínicos aparentes. Sin embargo, cuando el inóculo por error entró en tejido subcutáneo, el cerdo presentó un aumento de temperatura y postración, además de presentarse una severa inflamación en el sitio de la inoculación, en donde se formó un granuloma. Histológicamente consistió en la presencia de gotas liposolubles, células gigantes y macrófagos, indicándonos una fuerte reacción citotóxica del

adyuvante (Theilen y Hills 1982). Cuando se inoculó C. ovis vivo por la misma vía intraperitoneal a ratones, éstos desarrollan una extensiva formación de abscesos en órganos internos y una peritonitis fibrinopurulenta (Macle y Gyles, 1983). En el presente trabajo no se encontraron las alteraciones mencionadas en el peritoneo parietal y visceral en los cerdos inoculados por la misma vía debido a que sólo se utilizaron restos de pared celular de este microorganismo. Sin embargo, llama la atención el hecho de que si un inmunógeno con éste adyuvante no es aplicado en la cavidad peritoneal, pueden existir las reacciones indeseables como las que se presentaron en el cerdo cuando se inoculó por la vía subcutánea.

En el caso de los grupos experimentales, los animales del Grupo I, después de la inoculación del medio de cultivo, no mostraron elevación de temperatura y se mantuvieron dentro de los rangos normales. Mycoplasma hyopneumoniae provocó hipertermia después del desafío, como lo habían encontrado previamente Livingston et al (1972) y Ciprián et al (1988), además de que presentaron dificultad respiratoria ligera, encontrándose lo mismo que mostró Whittlestone (1979); solo uno de ellos presentó dificultad respiratoria severa, debido a que se aisló P. multocida, bacteria que se encuentra generalmente como flora normal y que es la causante del incremento de la signología clínica, tal como ocurrió a los cerdos tratados experimentalmente por Ciprián et al (1988) o como Falk et al (1990) con Mycoplasma hyorhinis y P.

multocida. Este grupo presentó mayor grado de lesión neumónica, que abarcó en promedio el 13 %. El tipo de lesiones encontradas correspondió a aquellas que se presentan después del día 28 postexposición experimental y fueron de un estado intermedio de la enfermedad (Ross, 1990); consistieron en la presencia de áreas resolutivas y disminución del tamaño pulmonar. La evaluación de las lesiones microscópicas pulmonares fué de poca utilidad para la valoración de la actividad protectora de las vacunas, tal como lo observaron Ross et al (1984).

Mycoplasma hyopneumoniae se logró aislar de un cerdo del Grupo I, sin embargo, en todos los pulmones se observó fluorescencia específica contra M. hyopneumoniae (Figs. 11 y 12), lo que indicó que todos los cerdos se infectaron; el no haber efectuado el aislamiento del micoplasma no implica la ausencia de éste; en muchos trabajos se ha observado este fenómeno, en donde se correlaciona un alto porcentaje de positividad en pruebas inmunológicas y un bajo porcentaje de aislamientos (Gigeret al., 1977; Mckean et al., 1979; Pijoan, 1973; Schuller y Swoboda 1977).

Los cerdos del Grupo II, después de la inoculación con la vacuna inactivada de M. hyopneumoniae sin adyuvante, mostraron pocos días de hipertermia después de la vacunación, en comparación con los demás grupos. Sin embargo, sólo presentaron elevación de temperatura dos días después del desaffo y la signología respiratoria fue ligera, ya que sólo se presentó en dos animales, el día 20 postdesaffo, después

del período de incubación.

En este Grupo II, los animales mostraron menos lesiones macroscópicas, sólo dos animales presentaron lesiones neumónicas (Fig. 5), lo que en promedio por grupo abarcó el 3 % y fueron lesiones que se caracterizaron por una consolidación, reducción y rugosidad pulmonar. El tipo de lesiones consistió en la presencia de áreas resolutivas, colapsadas, de consolidación rojiza; y correspondieron a aquellas que se presentan después del día 49 postexposición experimental, y fueron de estados tardíos de la enfermedad (Ross, 1990)

Mycoplasma hyopneumoniae se aisló de un cerdo del Grupo II, sin embargo, se observó fluorescencia específica en los pulmones de tres animales (Figs. 11 y 12), lo que indicó probablemente que estos cerdos no fueron capaces de eliminar el micoplasma previamente inoculado, datos similares encuentra Ross et al. (1984) pero con vacunas inactivadas con adyuvante. En nuestro caso la vacuna de M. hyopneumoniae sin adyuvante, redujo las lesiones neumónicas, pero no la eliminación del agente, situación que ocurre con todas las vacunas existentes (Davalu y Ross, 1990, Petersen et al., 1990; Ross et al., 1984; Ross, 1990). Del cerdo que presentó las lesiones neumónicas más severas, además de determinar la presencia de M. hyopneumoniae, se aisló P. multocida, tal como ocurrió en el estudio realizado por Ciprián et al. (1988).

Los animales del Grupo III, después de la inoculación con la vacuna inactivada de M. hyopneumoniae adicionada con adyuvante oleoso, mostraron mas días de hipertermia después de la vacunación, y presentaron elevación de temperatura por mas días después del desafío. La signología respiratoria fue ligera, pero se presentó durante tres días en dos animales después del día 20 postdesafío, presentándose posteriormente al periodo de incubación.

Los animales de este grupo mostraron más lesiones macroscópicas, en relación al Grupo II, dos animales presentaron lesiones neumónicas (Fig. 7), lo que en promedio por grupo abarcó el 6 %, y fueron lesiones que se caracterizaron por una consolidación, reducción y rugosidad pulmonar. El tipo de lesiones encontradas correspondieron a estados tardíos de la enfermedad (Ross, 1990) que consistieron en la presencia de áreas resolutivas, colapsadas de consolidación rojiza. Aunque las lesiones microscópicas fueron de tipo proliferativo, éstas fueron mas severas en relación con las encontradas en los otros grupos, por la presencia de infección secundaria.

El aislamiento de M. hyopneumoniae se realizó en dos cerdos en este grupo II. Sólo se observó fluorescencia específica en los pulmones de otros dos animales (Cuadro 8), lo que indicó probablemente que estos cerdos, no solo no fueron capaces de eliminar el micoplasma previamente inoculado, sino que la misma vacunación incrementó el desarrollo de las lesiones neumónicas. Datos similares

encuentran Ross et al (1984), con vacunas a base de extractos inactivados con calor y no así con células completas inactivadas con calor. En este caso la vacuna de M. hyopneumoniae con el adyuvante oleoso redujo las lesiones neumónicas en sólo dos animales, y aparentemente los otros dos cerdos incrementaron dichas lesiones. En el cerdo que presentó las lesiones neumónicas mas severas, además de determinar la presencia de M. hyopneumoniae, se aisló P. multocida, agravando la lesión tal como ocurrió en el estudio realizado por Ciprián et al (1988).

Los animales mostraron lesiones de diversa magnitud en los cornetes nasales. Se determinó la presencia de Bordetella bronchiseptica en estas rinitis, la cual pudo ser adquirida por los animales de la granja de origen.

En este trabajo se determinó la actividad protectora de dos bacterinas de M. hyopneumoniae, una sin y otra con un nuevo adyuvante, aplicadas en cerdos convencionales, por vía intraperitoneal, y evaluadas mediante el desafío experimental, para lo cual se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: signos clínicos, lesiones pulmonares e identificación del agente.

El Grupo testigo (I) en el cual se reprodujo la neumonia enzoótica, presentó el mayor grado de lesión neumónica, que consistió en lesiones de etapas intermedias de la enfermedad. Mycoplasma hyopneumoniae se identificó en todos los pulmones, lo que indicó que todos los cerdos estaban infectados.

En el Grupo II, se encontró el menor grado de lesión

neumónica, y fueron lesiones que correspondieron a estados tardíos de la enfermedad. El micoplasma se determinó en tres cerdos del grupo, indicando que no fueron capaces de eliminar el micoplasma previamente inoculado. En este caso la vacuna de M. hyopneumoniae sin adyuvante, redujo las lesiones neumónicas, pero no la eliminación del agente.

El promedio de las lesiones pulmonares encontradas en el Grupo III, fue menor a la mitad de las encontradas en el grupo control, y fueron lesiones que correspondieron a estados tardíos de la enfermedad. La presencia de M. hyopneumoniae se determinó en todos los cerdos de este grupo, lo que indicó probablemente que estos cerdos no fueron capaces de eliminar el micoplasma previamente inoculado, y que además la misma vacunación probablemente incrementó el desarrollo de las lesiones neumónicas. En este caso la vacuna de M. hyopneumoniae con el nuevo adyuvante, solo redujo las lesiones neumónicas en dos animales.

Aunque con el número de cerdos probado es difícil concluir o manejar estadísticamente los resultados, probablemente la aplicación intraperitoneal de la bacterina, aun sin adyuvante, logre la prevención de la Neumonía Enzoótica. Se corroboró también que Pasteurella multocida potencia el efecto de M. hyopneumoniae haciendo más severos los signos de la enfermedad.

En los cerdos que presentaron las lesiones neumónicas más severas, además de determinar la presencia de M. hyopneumoniae se aisló P. multocida, por lo que las

bacterinas no previnieron la infección del micoplasma, permitiendo además la colonización de la pasteurela.

Los resultados mostraron que los inmunógenos no previnieron la colonización del micoplasma en la mucosa respiratoria, lo que hasta el momento ninguna bacterina experimental, incluyendo la comercial, lo han logrado. Es importante recalcar que la bacterina ideal buscaba prevenir la colonización del micoplasma; los resultados obtenidos mostraron sólo la reducción de las lesiones pulmonares. Este hecho no es particular de la Neumonía Enzootica de cerdos, ya que se ha observado en otros ensayos (Ross, 1984), como en seres humanos, en donde la bacterina utilizada para prevenir la infección de Mycoplasma pneumoniae, causante de la Neumonía atípica primaria, tuvo una eficacia del 70%, pero no se logró prevenir la presencia del micoplasma en la garganta (Drutz y Graybill, 1988).

Con respecto al adyuvante observamos que no produjo lesión en peritoneo y si una fuerte reacción inflamatoria en tejido subcutáneo, pero no favoreció el efecto protector, lo cual concuerda con los datos encontrados por Sicchitano et al (1981), el cual al inocular a un grupo de ovinos intraperitonealmente con ovoalbumina y adyuvante completo de Freund y a otro grupo con ovoalbumina por vía intratraqueal, encuentra que la inclusión del adyuvante no estimuló significativamente la respuesta de anticuerpos en relación a la aplicación intratraqueal. Es probable que en nuestro trabajo la liberación del micoplasma del adyuvante hubiera

requerido más tiempo para producir una buena respuesta y por ello al momento del desafío no existiera la suficiente inmunidad para proteger a los animales de la infección: lo que no ocurrió en el grupo inoculado con la bacterina sin adyuvante, lo cual favoreció a que rápidamente fuera procesado y metabolizado, produciendo así una rápida respuesta inmune. Se considera por algunos autores que las vías intravenosa e intraperitoneal son similares y no estimulan una fuerte inmunidad, sin embargo se utilizan, sobre todo la intravenosa para detectar del antígeno los llamados epítopes inmunodominantes, que estimulan a su vez una rápida respuesta, produciendo los denominados anticuerpos inmunodominantes (Dr. Morilla, comunicación personal, 1985). Por ello cabe replantear el papel de C. ovis como adyuvante, ya sea en otros animales experimentales, inoculados por diferentes vías, comparando su respuesta con los adyuvantes conocidos o bien en el mismo cerdo, utilizando la misma vía intraperitoneal con otros antígenos o con el mismo micoplasma y con desafíos a tiempos mayores.

Hasta el momento las bacterinas utilizadas para la prevención de la neumonía enzoótica han sido aplicadas por la vía parenteral, demostrando que las vías sistémicas con frecuencia son ineficientes para estimular una respuesta protectora en mucosas, a pesar de producir una alta respuesta de anticuerpos. Las secreciones de las vías respiratorias bajas contienen mayores proporciones de IgG que de IgA, que las observadas en fosas nasales y vías respiratorias altas.

sin, embargo las inmunoglobulinas mas eficientes en mucosas son las IgA (Ernst et al. 1988). El planteamiento en este trabajo fue que al estimular la respuesta inmune por la vía intraperitoneal con M. hyopneumoniae, en el tejido linfoide asociado al intestino, los linfocitos estimulados colonizarían al tejido linfoide asociado a bronquios y segregarían IgA, ya que los datos en infección experimental de neumonia enzootica indican que esta inmunoglobulina se encuentra en secreciones traqueobronquiales (Young et al. 1990).

6. CONCLUSIONES

Se evaluó la capacidad de prevenir la Neumonía Enzoótica mediante el uso de dos inmunógenos, uno con un nuevo adyuvante y otro sin el, aplicados por vía intraperitoneal en cerdos convencionales, encontrándose :

1. La inoculación intraperitoneal del nuevo adyuvante elaborado con Corynebacterium ovis, no produce reacciones, ni signos clínicos aparentes en el cerdo.
2. La inoculación subcutánea del adyuvante produce una fuerte reacción inflamatoria y postración en el cerdo.
3. Los cerdos inmunizados con la bacterina de Mycoplasma hyopneumoniae sin adyuvante presentaron menores lesiones pulmonares, en relación a la inmunización del micoplasma con el nuevo adyuvante, sin embargo, ambas no previnieron la colonización del micoplasma en el pulmón.
4. Ninguno de los dos inmunógenos protegió totalmente a los cerdos de la infección de Mycoplasma hyopneumoniae.

7. BIBLIOGRAFIA

Adegbove D.S.: A review of mycoplasma induced immunosupresion. Brit. Vet. J. 134 :536-556.(1978).

Armstrong C.H. and Friis N.F.: Isolation of Mycoplasma hyopneumoniae from swine in the United States . Am.J. Vet. Res. 42 : 1030 -1032.(1981).

Armstrong C.H.: Mycoplasmal pneumonia of swine. International Swine. Update (Squibb) Issue One P. 1,6 y 8.(1982).

Armstrong C.H., Freeman.J., Sands-Freeman L, Lopez-Osuna M., Young T. and Runnels L. J., Comparison of the enzyme'linked immunosorbent assay and the indirect hemagglutination and complement fixation test for detecting antibodies to Mycoplasma hyopneumoniae. Can. J. Comp. Med. 47 : 464 - 470 (1983).

Betts : Les techniques gnotobiotiques et leur application dans l'eradication des maladies respiratoires du porc. Ann. Med. Vet. 116: 319 - 330.(1972).

Boughton L. and Thorns C.J.: Mycoplasma laboratory handbook Ministry of Agryculture, Fisheries and Food Central Veterinary Laboratory New Haw, Weybridge, Surrey, England. 1975.

Brassine M., Dewaele A. and Browers J : Influence de l'entendeue des lesion pulmonaires sur la croissance et

l'homogénéité des porc à liengrais. Ann. Med. Vet. 115 : 157-174. (1971).

Bruggman, S., Keller H., Bertschinger, H.U., and Engberg B.: Quantitative detection of antibodies to Mycoplasma suis pneumoniae in pigs sera by an enzyme linked immunoabsorbent assay. Vet. Rec. 101: 109 -111. (1977 a).

Bruggman S., Engberg B. and Ehrensperger F. : Demonstration of M. suis pneumoniae in pig lung by the enzyme linked immunoperoxidase technique. Vet. Rec. 101: 137. (1977 b).

Burch D.G.S. : The incidence and distribution of lung lesions, associated with enzootic pneumonia, in pig from 2 farms, and the effect of the extent of these lesions on weight gains. Proceeding Int. Pig Vet. Soc. Congress Mexico p. 95. 1982 a.

Burch. D.G.S.: Evaluation of efficacy of tiamulin hydrogen fumarate, when included in the feed at levels of 20 and 30 ppm. in the improvement of weight gain feed conversion efficiency in the presence of Enzootic Pneumonia. Proceeding Int. Pig. Vet. Soc. Congress México. p. 102. 1982 b.

Ciprián A., Ochoa G., y Pijoan C.: Aislamiento de Mycoplasma hyorhinis a partir de pulmones neumónicos de lechones en México. Memorias de la Reunión Anual de Investigación en Medicina Veterinaria, 1978.

Ciprián C. : Aislamiento y caracterización de micoplasmas a partir de pulmones neumónicos de ovinos y caprinos de México. Tesis de Maestría. ENEPC - INIP.1979.

Ciprián A. Cruz T. and Pijoan C.: Specific fluorescence against Mycoplasma hyopneumoniae in pneumonic lungs of pig in México. Proceeding Int. Pig Vet. Soc. Congress. México. p. 90. 1982.

Ciprián C.A., Pijoan C., Cruz T., Camacho J., Tórtora J., Colmenares G., López R.R. y De la Garza M. : Mycoplasma hyopneumoniae increases the susceptibility of pigs to experimental Pasteurella multocida pneumonia. Can. J. Vet. Res. 52 : 434-458. (1988).

Cowan. S.T. and Steel K.J. : Manual for the Identification of Medical Bacteria. Second edition. Cambridge University Press, Cambridge. 1974.

Dayalu K.I. and Ross R.F.: Evaluation of experimental vaccines for control of porcine pneumonia induced by Mycoplasma hyopneumoniae. Procc. Int. Pig. Vet. 11: 83.1990

Degeeter M.H., Mercadillo A.J. and Luchsinger J.H. : Efficacy of lincomycin administered in the feed for the control of mycoplasmal pneumonia in swine. Proceeding Int. Pig. Vet. Soc. Congress. México., p. 290. 1982.

Drutz J.D. y Graybill J.R.: Enfermedades infecciosas en

Inmunologia basica y clinica. Manual Moderno. 6a. Edicion. p.574. 1988.

Erno H.: Mycoplasmas Use of polyvalent antisera for identification by indirect immunofluorescence. Acta Vet. Scand. 18: 176 - 186. (1977).

Ernst B.P., Underdown B.J. y Brenenstock J. : Inmunidad de los tejidos mucosos en Inmunologia basica y clinica. Manual Moderno. 6a. Edicion. p 156 - 163. 1988.

Etheridge, J.R., Cottew G.S. and Lloyd L.C.: Isolation of Mycoplasma hyopneumoniae from lesions in experimentally infected pigs. Aust. Vet. J. 55: 356 - 359. (1979 a).

Etheridge J.R. and Lloyd L.C.: A complement fixation test for Enzootic Pneumonia of pigs using a complement dilution method. Aust. Vet. J. 56: 101 - 105. (1979 b).

Etheridge, J.R. Lloyd L.C. and Cottew G.S.: Resistance of Mycoplasma hyopneumoniae to chlortetracycline. Aust. Vet. J. 55: 40. (1979 c).

Fahay G. : Sencillos medidas evitan problemas respiratorios. Sintesis Porcina. Vol 1. No. 2 p. 15. (1982).

Falk K.S. : Enzootic pneumonia of pigs studies on field maternal on the relationship between the extent of lungs lesion and the demonstration of Pasteurella multocida and Mycoplasma hyorhinis. Proceeding Int. Pig. Vet. Soc. p. 1990.

Feldner J., Gobel U. and Bredt W. : Mycoplasma pneumoniae adhesin localized to tip structure by monoclonal antibody. Nature, 298: 765-766 (1982).

Flores R.: Inmunógenos en la prevención de neumonías. Memorias del I Curso Latinoamericano de las Enfermedades Respiratorias del Cerdo. ENEP Cuautitlán, Mex., p. 147. 1978.

Forster T.C., Ridway I.E., and Baines S.: In vitro studies on tiamulin and kidasamycin against a range of organism including pig pathogens. Proceeding Int. Pig. Vet. Soc. Congress, Mexico City, p. 284. 1982.

Friis, N. F.: Mycoplasma suis pneumoniae isolated in Denmark. Acta Vet. Scand. 10: 295 - 297. (1969).

Friis, N.F.: Mycoplasmas cultivated from the respiratory tract of danish pigs. Acta Vet. Scand. 12: 116 - 119. (1971 a).

Friis N.F. : A selective medium for Mycoplasma suis pneumoniae. Acta Vet. Scand. 12: 454 - 456. (1971 b).

Friis N.F.: Mycoplasma suis pneumoniae and Mycoplasma flocculare in the growth precipitation test. Acta Vet. Scand. 18 : 168 - 175. (1977).

Friis N.F. and Jensen P.: Serological comparison of type strains of porcine, bovine and ovine mycoplasmas with atypical colony morphology. Acta Vet. Scand. 25: 29 - 35. (1984).

Freeman M.J., Armstrong C.H. and Sands L.L.: Evaluation of the ELISA for diagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine (MPS). II Antigenic relations between M. flocculare of reference antisera and sera of MPS affected swine. Int. Pig Vet. Soc. Congress. México. p. 92. 1982.

Geary S.J. and Walczak E.M.: Cytophatic of whole cells and purified membranes of Mycoplasma hyopneumoniae. Infect. Immun. 41: 132 - 136.(1985 a).

Geary S. and Walczak E.M.: Isolation of a cytophatic factor from Mycoplasma hyopneumoniae. Infect. Immun. 48: 576 - 578.(1985 b).

Gatmeittan M. O., Sarmiento E.: Tiamulin by injection for the tratment of swine pneumonia in the Philippines. Proceedings Int. Pig Vet. Soc. Congress, México. p. 103. 1982

Giger T., Bruggman S., Nicolet J. : Immunological methods for the detection of Mycoplasma hyopneumoniae in frozen sections and bronchial smears. Schweizer Archiv für Tierheilkunde. 119: 125-134. (1977).

Goodwin R.F.W.: The possible rol of histerectomy and related procedures for the erradication and control of pig diseases in Britain. Vet. Rec. 77: 1070. - 1076.(1965).

Goodwin R.F.W.: The comparative suceptibility of histerectomy proced, calostrum deprived pigs and naturally born, enzootic pneumonia free pigs to enzootic pneumonia. J. Hyg. Camb. 69:

391 - 397.(1971).

Goodwin. R.F.W.: Isolation of Mycoplasma suis pneumoniae from the nasal cavities and lungs of pigs affected with enzootic pneumonia or exposed to this infection. Res. Vet. 13: 262 - 267 (1982 a).

Goodwin R.F.W.: Neumonía enzoótica porcina. International Swine Update, SQUIBB No. 1 Jul., p 1 - 8. 1982 b.

Goodwin R.F.W.: Apparent reinfection of enzootic pneumonia free pig herd early signs and incubation period. Vet. Rec. 115: 320 - 324.(1984).

Goodwin R.F.W.: In vitro activity of tiamulin against porcine mycoplasmas. Res. Vet. Sci. 38: 124 - 125.(1985 a).

Goodwin R.F.W. : Apparent reinfection of enzootic pneumonia free pigs herds research for possible causes. Vet. Rec. 116 : 690 - 694.(1985 b).

Goodwin R.F.W. and Whitlestone P. : Enzootic Pneumonia of pigs : Immunization attempts inoculating Mycoplasma suis pneumoniae antigen by various routes and with different adjuvants. Br. Vet. J. 122: 456-464. (1973).

Hannan, P.C. T. Banks, R.M. , Bhogal, B.S., Blanchflower, E. E., Donald A.C., Fish, J.P. and Smith, D.: Reproducible pneumonia in gnotobiotic piglets induced with broth cultures of Mycoplasma hyopneumoniae and the effect of animal passage on virulence. Res. Vet. Sci. 36: 153 - 163.(1984).

Hodges, R.T., Bett A.O. and Jennings, A.R.: Production of pneumonia in gnotobiotic pigs with pure cultures of Mycoplasma hyopneumoniae. Vet. Rec. 84: 268 - 273.(1969).

Hsu F.S., Yang P.C. and Wung S.C.: Tiamulin injectable for the treatment of swine bacterial pneumonia. Proceeding Int. Pig. Vet. Soc. Congress, México.p 104. 1982.

Huhn, R.G.: The action of certain antibiotics and other on Swine Enzootic Pneumonia . Can. J. Comp. Med. 35:1 - 4.(1982)

Itraraksa Y., Engen L.R. and Switzer W.P.: Pulmonary and hematologic changes in swine with Mycoplasma hyopneumoniae pneumonia. Am. J. Vet. Res. 45 : 474 - 477.(1983).

Jansson R.: Evaluation of some serological techniques for the identification of Mycoplasma hyorhinis and Mycoplasma suis pneumoniae. Acta Vet. Scand. 15: 274 - 282.(1974)..

Klinkert M.,Herrman R. and Schaller H.: Surface proteins of Mycoplasma hyopneumoniae identified from an Escherichia coli expression plasmid library. Infect. Immun. 49: 329-335.(1985).

Kishima M. and Ross R.F.: Suppressive effect of nonviable Mycoplasma hyopneumoniae on phytohemagglutinin induced transformation of swine lymphocytes. Am. Vet. Res. 46 : 2366 - 2368. (1985).

Kishima, M., Ross R.F. and Kuniyasu C.: Cell mediated and humoral response to Mycoplasma hyopneumoniae in pigs enhanced by dextran sulfate. Am. Vet. Res. 46: 456 - 461.(1985) .

Kobish M.: Serological identification of porcine mycoplasmas.
Int. Pig Vet. Soc. Congress, México. p. 93. 1982.

Kobish M.: Les mycoplasmes du porc. Station de pathologie porcine de Ploufragan 2240. 1984.

Kristensen B., Paros Ph., Nicolet J., Wanner M. and Deweck A.L.: Cell mediated and humoral immune response in swine after vaccination and natural infection with Mycoplasma hyopneumoniae. Am. J. Vet. Res. 42: 784 - 788. (1981).

Lam K.M. and Switzer W.P.: Mycoplasmal Pneumonia of Swine Development of an indirect hemoagglutination test. Am. J. Vet. Res. 32: 1731 - 1736. (1971 a).

Lam K.M. and Switzer W.P.: Mycoplasmal Pneumonia of Swine Active and Passive immunizations. Am. J. Vet. Res. 32: 1737 - 1741. (1971 b).

Livingstone C.W., Stair E.L., Underhal N.R. and Mebus C.A.: Pathogenesis of mycoplasmal pneumonia in swine. Am. J. Vet. Res. 33: 2249-2258. (1972).

Lloyd L.C., Badman T., Etheridge J.R., Kmckechnie and Eyer H.: Assesment of a complement fixation test to detect Mycoplasma hyopneumoniae infection in pigs. Aust. Vet. J. 61: 216 - 218. (1984).

Madsen P. A revaluation of the role of Mycoplasma suis pneumoniae s. hyopneumoniae in regard to swine herd health. proceeding Int. Pig Vet. Soc. Congress. México City. p.

97.1982.

Meszaros, J., Stipkovits L., Antalt T., Szabo I. and Veszely P.: Erradication of some infections pig diseases by perinatal tiamulin treatment and early weaning. Vet. Rec. 116: 8 - 12. (1985).

Minitis O.P. Gnotobiotic methods. Proceeding Int. Pig Vet. Soc. Congress. México. p. 307. 1982.

Mckean J.D. et al: Evaluation of diagnostic procedures for detection of rickettsial pneumonia of swine. J.A.V.M.A. 174: 177 - 180. (1979).

Morilla G.A. y Bautista G.R.: Manual de inmunología. Primera edición. Edit. Diana. México p. 81 - 89. 1986.

Morrison. R.B., Pijoan, C. and Leman, A.D.: Association between enzootic pneumonia and performance. Pig News and Information, 7: 23 - 31. (1986).

Muckle C.A. and Gyles L.C. : Relation of lipid content and exotoxin production to virulence of Corynebacterium pseudotuberculosis in mice. Am. Res. Vet. 49: 1149-1153. (1983).

Osebold J.W. : Mechanisms of action by immunologic adjuvants. JAVMA. 191 : 983 - 987. (1982).

Patterson E.B. and Bentley, O.E.: Efficacy of a long acting oxytetracycline injectable against artificial and natural respiratory infections in pigs. Proceeding Int. Pig Vet. Soc.

Congress. Mexico City p. 99. 1982.

Petersen G., Weiss D., Egan J., Korshus J., Peters R. and Miron H. : Response to Mycoplasma hyopneumoniae vaccination in nursing piglets. Proc. Int. Pig. Vet. Soc. 11: 84. 1990.

Piffer A.I. and Ross R.F.: Effect of age on susceptibility of pigs to Mycoplasma hyopneumoniae pneumonia. Am. J. Vet. Res. 45 : 478 - 481. (1983).

Pijoan C.: Studies of Mycoplasmas in relation to porcine respiratory diseases. PhD Thesis. Univ. of Surrey. 1973.

Pijoan C.: Micoplasmosis en diagnóstico de las enfermedades del cerdo. Edit. Pijoan y R. Necochea, p. 522 - 531. 1982.

Pijoan C. Fuentes, M. y Noyes, E. : Enfermedades respiratorias bacterianas del cerdo: Control por antibioticos y vacunas. A.N.P.O.R.C. 48: 36 - 43. (1986).

Pointon A.M.: Evaluation of the effect of tiamulin hydrogen fumarate fed at 25 ppm on performance responses of pigs infected with enzootic pneumonia. Aust. Vet. J. 62: 384 - 385. (1983).

Pointon A.M., Byrt D. and Hean P. : Effect of enzootic pneumonia of pigs on growth performance. Aust. Vet. J. 62 : 13 - 18. (1985 a).

Pointon A.M., Hean P. and McCloud P. : Enzootic pneumonia of pigs in south Australia. Factors relating to incidence of

disease. Aust. Vet. J. 62: 98 - 101. (1985 b).

Ro L.H. and Ross R.F.: Comparison of Mycoplasma hyopneumoniae strains by serologic methods. Am. J. Vet. Res. 44: 2087 - 2094. (1983).

Roberts D.H.: Inhibition of lymphocyte transformation induced by phytohemagglutinin with porcine mycoplasma. Br. Vet. 128: 585 - 590. (1972).

Ross, R.F.: Chronic pneumonia of swine with emphasis on mycoplasmal pneumonia. Proceeding American Association of Practitioners, U.S.A. (1984).

Ross, R.F. : Use of conventional and molecular biological methods in diagnosis and prevention of swine mycoplasmosis. Compendio de las enfermedades del Cerdo y su relación con la Biología Molecular. Edit. Ciprián C y Mendoza S. Septiembre. Mex. D.F.. p. 46-54. (1990).

Ross R.F. , Zimmerman Erickson B.J. and Young F.T.: Characteristics of protective activity of Mycoplasma hyopneumoniae vaccine. Am. J. Vet. Res. 45: 1899-1904. (1984)

Sands LL., Freeman M.J., Armstrong C.H.: Evaluation for the ELISA for diagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine (MPS) Cross reactivity between M. hyopneumoniae and other porcine mycoplasmas to reference antisera. Int. Pig Vet. Soc. Congress. México. p. 91. 1982.

Schuller W., Swoboda R., Baumgartner W. : Comparisson of various laboratory methods for the diagnosis of enzootic pneumonia in swine. Wiener Tieraerztliche Monatsschrift 64: 236 - 241. (1977).

Scicchitano A., Hussband J. and Glancy L. : Contribution of intraperitoneal immunization to the local immune response in the respiratory tract of sheep. Immunology, 53 : 375 - 384. (1984).

Slavik M.F.: Adaptation of a latex agglutination tube test for diagnosis of Mycoplasma hyopneumoniae swine pneumonia. Diss. Abst. Int. 379: 2703 - 2704. (1976).

Slavik F. and Switzer P.: Comparision of a microtitration complement fixation test and tube latex agglutination test for diagnosis of Mycoplasma hyopneumoniae swine pneumonia. Am. J. Vet. Res. 42: 862 - 864. (1981).

Stipkovits L., Laber, G., Schutze E. : Tiamulin, a new antibiotic for controlling enzootic pneumonia in swine. Deutsche tieraerztliche Wochenschrift 65: 464 - 466. (1978)

Stipkovits L., Schimmel D. and Varga L.: Comparative study of swine mycoplasma species. Act. Vet. Acad. Scie. Hung. 24: 187-197. (1974).

Suter, M., Kobisch, M. and Nicolet J. : Stimulation of immunoglobulin containing cells and isotype specific antibody response in experimental Mycoplasma hyopneumoniae

infection in specific pathogen free pigs. Infect. Immun. 49: 615 - 620. (1985).

Switzer W. and Ross F. : Mycoplasmal diseases in Diseases of Swine. Edit. Dunne H. and Leman R. Forth Edition. p.741- 764. (1978).

Tajima M., Yagihashi T., Nunoya T. : Ultraestructure of mycoplasmal capsules as revealed by stabilization with antiserum and staining with ruthenium red. Jpn. J. Vet. Sci. 47: 217 - 223. (1985).

Tajima M., Yagihashi T., Nunoya T., Takeuchia, Ohashi F. : Mycoplasma hyopneumononiae infection in pigs immunosuppressed by thymectomy and treatment with antithymocyte serum. Am. J. Vet. Res. 45: 1928 - 1932. (1983).

Theilen H.G. and Hills D. : Comparative aspecty of cancer immunotherapy : Immunologic methods uses for treatment of spontaneous cancer in animals. JAVMA 181 : 1134 -1141. (1982).

Whittlestone P. : Immunity to mycoplasmas causing respiratory diseases in man and animal. Ad. Vet. Scien. Comp. Med. 20: 277-307. (1976).

Yaghiashi T., Nunoya T., Mitui T. and Tajima M. : Effect of Mycoplasma hyopneumononiae infection on the development of Haemophilus pleuropneumononiae pneumonia in pigs. Jpn. J. Vet.

Sci. 46: 705 - 713. (1984).

Yamamoto K. and Ogata M. : Mycoplasmal and bacterial flora in the lungs of pigs. Proceeding Int. Pig Vet. Soc. Congress. Mexico. p. 94. 1982.

Young F.T., Ciang Yu-Wei and Ross F.R. : Evaluation of local and systemic humoral responses to Mycoplasma hyopneumoniae. Proceeding Int. Pig Vet. Soc. p.97. (1990).

Young F.T. and Ross F.R. : Assesment of antibody response of swine infected with Mycoplasma hyopneumoniae by immunoblotting. Am. J. Vet. Res. 48 : 651 - 656. (1987).