

11680



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

“EFECTO DE LA INFECCION EXPERIMENTAL DE Mycoplasma hyopneumoniae SOBRE LA INMUNIDAD CELULAR EN EL PULMON DE LECHONES”.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE: DOCTOR EN CIENCIAS (AREA MICROBIOLOGIA) PRESENTA: TONATIUH ALEJANDRO CRUZ SANCHEZ

DIRECTORES: DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO. DR. ELISEO HERNANDEZ BAUMGARTEN.
ASESOR: DR. MARCO ANTONIO VEGA LOPEZ.

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO. 2000

260326



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

MIEMBROS DEL JURADO

DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO
PRESIDENTE

DR. MARCO ANTONIO VEGA LOPEZ
PRIMER VOCAL

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
SEGUNDO VOCAL

DR. ELISEO HERNANDEZ BAUMGARTEN
TERCER VOCAL

DR. FRANCISCO SUAREZ GÜEMES
SECRETARIO

DR. FRANCISCO TRIGO TAVERA
SUPLENTE

DR. JORGE TORTORA PEREZ
SUPLENTE

*Nunca encontraremos la verdad si nos conformamos con lo
que ya ha sido encontrado.*

GILBERT DE TORNAL

A mis tres grandes amores

Amparo

Sarai

Etni Alejandra

A la memoria de mi padre

A mi madre y hermana

A mi familia

Agradecimientos

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a todos mis compañeros y amigos, que de una u otra forma participaron y me apoyaron durante la realización de este trabajo:

Abel, por los años de amistad y por enseñarme a recorrer el mismo sendero

Dr. Eli, por su plática de enseñanza, su paciencia y guía.

Dr. Marco Antonio Vega, por sus enseñanzas acerca de las técnicas inmunohistoquímicas y su orientación en el mejoramiento de este trabajo.

Dr. Jorge Tórtora, por sus ánimos y el análisis histopatológico.

Doctores Juan Antonio Montaraz, Francisco Suárez, Francisco Trigo, por sus contribuciones durante la revisión de esta tesis.

Dr. F. Zuckerman (Universidad de Illinois, USA), por proporcionar los anticuerpos monoclonales para este estudio.

Mis amigos Susana Mendoza, Horacio Lara, Frank Díaz, Edgar Aguilera, Andrés Romero, David Trujillo, Abraham Massa, Víctor Quintero.

Rodolfo Robles, por su apoyo en microfotografía.

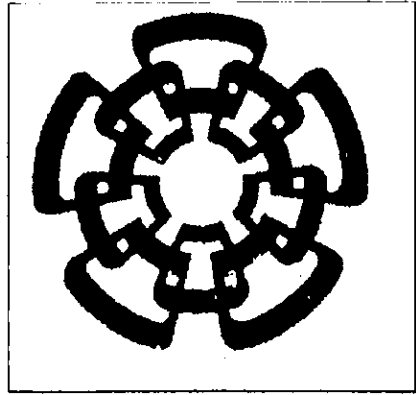
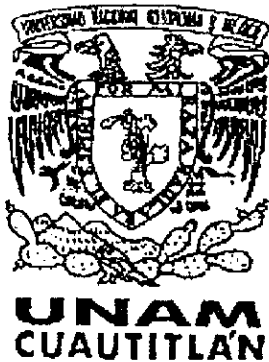
Ing. Juan R. Garibay Bermúdez, por su apoyo en el análisis estadístico.

Gilberto Ochoa y Luz María Ortega, por el apoyo de siempre.

Yolanda Romero, por la preparación de las laminillas para el estudio inmunohistoquímico.

Mis alumnos Claudia León, Berenice Gutiérrez, Froylán Hernández, Hilda Córdoba, Nora González.

Mis amigos de Campo 4 de la FES-C.



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Enfermedades Respiratorias del Cerdo de la Coordinación General de Investigación y Estudios de Posgrado pertenecientes a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México y en el Laboratorio 2 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV-IPN).

Este trabajo fue apoyado por :

El Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado a Tesis Doctorales de la Coordinación General de Estudios de Posgrado de la U.N.A.M. con las claves del Proyecto No. 100304 ,100302 y 100303.

La Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la U.N.A.M.

INDICE

INDICE DE CUADROS	a
INDICE DE FIGURAS	b
RESUMEN	c
SUMMARY	d
1. INTRODUCCION	1
1.1 Antecedentes.	1
1.2 Características generales de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .	1
1.3 Antígenos de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .	2
1.4 El sistema inmune celular del aparato respiratorio del cerdo.	3
1.5 Características generales de las micoplasmosis respiratorias.	8
1.6 Inmunopatogenia de los micoplasmas.	8
1.7 Poblaciones de linfocitos T en el cerdo.	16
2. JUSTIFICACIÓN	21
3. OBJETIVO GENERAL	21
4. MATERIAL Y METODOS	22
4.1 Selección de cerdos libres de enfermedades respiratorias.	22
4.2 Producción de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .	22
4.3 Producción del homogeneizado pulmonar.	22
4.4 Grupos experimentales y diseño experimental.	23
4.5 Inoculación de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .	23
4.6 Evaluación de lesiones macroscópicas.	24
4.7 Histopatología.	24
4.8 Aislamiento de micoplasmas y pasteurellas.	24
4.9 Detección del micoplasma por inmunofluorescencia directa.	26

4. 10	Determinación del título de anticuerpos por Prueba de ELISA Tween 20.	27
4. 11	Determinación de marcadores de células T.	28
4. 12	Análisis Estadístico.	30
5.	RESULTADOS	33
5. 1	Evolución de los signos clínicos en los cerdos de los grupos experimentales.	33
5.1.1	Temperatura.	33
5.1.2	Signos respiratorios.	33
5.1.2.1	Tos.	33
5.1.2.2	Disnea.	34
5. 2	Lesiones macroscópicas.	34
5. 3	Lesiones microscópicas.	34
5. 4	Detección de <i>M. hyopneumoniae</i> en tejido pulmonar por la prueba de inmunofluorescencia directa.	34
5. 5	Microorganismos recuperados.	35
5. 6	Detección de anticuerpos contra <i>M. hyopneumoniae</i> mediante la prueba de ELISA.	35
5. 7	Determinación de las células T por cuentas totales.	35
5. 8	Determinación de células T en unidades por área.	36
5. 9	Relación de las células CD4+/CD8+ en el pulmón de los cerdos en diferentes etapas de la infección, determinadas por la prueba de inmunoperoxidasa.	36
5. 10	Análisis estadístico.	36
6.	DISCUSIÓN	55
7.	CONCLUSIONES	70

8. APENDICES	71
8 A Cepas de referencia y medios de cultivo de micoplasmas.	71
8 B Prueba de ELISA Tween 20.	74
8 C Obtención de sueros de referencia y producción de sueros hiperinmunes.	79
8 D Prueba de Inmunofluorescencia.	85
8 E Prueba de Inmunoperoxidasa directa.	90
9. LITERATURA CITADA	94

INDICE DE CUADROS

Cuadro	PAG
1. Características de las enfermedades respiratorias micoplasmales.	9
2. Respuesta celular en infecciones por micoplasmas.	13
3. Distribución de las lesiones macroscópicas en los pulmones de los cerdos.	37
4. Porcentaje de lesiones encontradas en los cerdos inoculados.	38
5. Estudio de las lesiones microscópicas encontradas en los cerdos inoculados	40
6. Resultados de la prueba de inmunofluorescencia de los cerdos infectados con <i>M. hyopneumoniae</i> .	41
7. Microorganismos presentes en el pulmón de los cerdos.	45
8. Resultados de la prueba de ELISA Tween 20 (Enzyme labeled immunosorbent assay) para detectar anticuerpos contra <i>M. hyopneumoniae</i> en el suero de los cerdos inoculados y testigos.	46
9. Valores de la relación CD4+/CD8+ en el pulmón de cerdos testigo e infectados con <i>M. hyopneumoniae</i> .	53
10. Resumen de los resultados en encontrados en los animales testigo e infectados con <i>M. hyopneumoniae</i> .	54
11. Resultado de la reacción cruzada de la Prueba ELISA Tween 20.	78
12. Calendario de inmunización de los conejos.	80
13. Correlación entre aislamiento y fluorescencia en los pulmones estudiados.	89

LISTA DE FIGURAS

FIGURA.	PAG
1. Esquema de la localización de los linfocitos en los diferentes compartimientos del pulmón porcino.	6
2. Distribución del BALT en el cerdo.	7
3. Subpoblaciones de linfocitos en el cerdo.	18
4. Diagrama del diseño experimental	31
5. Temperatura de los animales.	33
6. Prueba de inmunofluorescencia.	42
7. Cinética del efecto de la inoculación de <i>M. hyopneumoniae</i> sobre las células CD4+ en animales control e inoculados determinados por técnica inmunohistoquímica mediante la prueba de inmunoperoxidasa (Por cuentas totales).	47
8. Cinética del efecto de la inoculación de <i>M. hyopneumoniae</i> sobre las células CD8+ en animales control e inoculados determinados por técnica inmunohistoquímica mediante la prueba de inmunoperoxidasa (Por cuentas totales).	48
9. Cinética del efecto de la inoculación de <i>M. hyopneumoniae</i> sobre las células CD4+ en animales control e inoculados determinados por técnica inmunohistoquímica mediante la prueba de inmunoperoxidasa (unidades /área).	49
10. Cinética del efecto de la inoculación de <i>M. hyopneumoniae</i> sobre las células CD8+ en animales control e inoculados determinados por técnica inmunohistoquímica mediante la prueba de inmunoperoxidasa (unidades /área).	50
11. Sección de pulmón de un cerdo infectado con <i>M. hyopneumoniae</i> y sacrificado a los 20 días postinoculación.	51
12. Sección de pulmón de un cerdo infectado con <i>M. hyopneumoniae</i> y sacrificado a los 20 días.	52
13. Cinética de la relación entre células CD4+/CD8+ en el pulmón de cerdos testigo e infectados con <i>M. hyopneumoniae</i> en diferentes etapas de la infección.	53

RESUMEN

En este trabajo se estudiaron las lesiones pulmonares, la producción de anticuerpos, la reacción de algunas subpoblaciones de células T y el desarrollo de la respuesta inmune celular en el pulmón del cerdo infectado con *M. hyopneumoniae*.

Doce cerdos de un mes de edad fueron inoculados intratraquealmente con un homogeneizado pulmonar conteniendo *M. hyopneumoniae*. (10 mls. por animal con un título de 10^4 CCU/ml). Dos cerdos fueron sacrificados los días 0, 4, 8, 12, 16 y 20 postinoculación junto con un testigo inoculado intratraquealmente con medio de Fris. Al sacrificio fue analizada la extensión de las lesiones pulmonares. Se tomaron muestras de las lesiones para someterlas a inmunofluorescencia directa. De cada uno de los cerdos fue obtenido suero para la titulación de anticuerpos por medio de la prueba de ELISA Tween 20, establecida en el laboratorio. Otras muestras pulmonares con lesiones fueron fijadas en paraformaldehído y analizadas por inmunohistoquímica para células T, utilizando anticuerpos monoclonales específicos para antígenos CD4 y CD8. Las células positivas fueron contadas determinando su densidad en el tejido (número de células/unidad por área) mediante un analizador de imágenes asistido por computadora. Para histopatología se realizó la tinción de hematoxilina y eosina (H.E.). Se realizó el aislamiento de *M. hyopneumoniae* y los aislamientos fueron identificados por la prueba de inhibición de crecimiento. Las lesiones pulmonares macroscópicas se comenzaron a apreciar a partir del día 4 P.I. con un 11.4% de lesión y al día 20 P.I. se observó un promedio de 19%. El suero de los animales inoculados resultó positivo a la prueba de ELISA Tween 20 a partir del día 12, alcanzando el último día del experimento el título más alto, en cambio los controles permanecieron negativos. Los cerdos inoculados fueron positivos a la prueba de inmunofluorescencia a partir del día 8 postinoculación. Todos los cerdos fueron positivos al aislamiento de *Mycoplasma hyopneumoniae*. La histopatología mostró el desarrollo de lesiones características a partir del día 4 hasta el día 20 P.I., con infiltración linfocitaria peribronquial y penvascular. Las células T CD4+ presentaron una localización preferencial alrededor de bronquios y bronquiolos. Se observaron dos picos de elevación de estas células al día 8 y 12 P.I. En el día 8 P.I. se apreció una activación del tejido linfoide asociado a bronquios (BALT), así como numerosas células plasmáticas, coincidiendo esto con la respuesta de anticuerpos observada en la prueba de ELISA. Con respecto a las células CD8+, estas no tuvieron un sitio preferencial, siendo siempre mayor el número de ellas en relación a las células CD4+, circulando en todo el tejido. Las células CD8+ también mostraron una elevación el día 20 P.I., aunque esta no fue estadísticamente significativa. Al día 12 P.I. se manifestó el inicio de áreas de consolidación y se observaron en la histopatología que correspondía a la presencia de polimorfonucleares y macrófagos. En el día 20 P.I. se apreció un elevado número de células CD8+ que coincide con el momento en que se observó mayor lesión pulmonar. Los resultados indican que se activaron significativamente los linfocitos CD4+ ($p > 0.05^*$) en los primeros estadios de la enfermedad y para los linfocitos CD8+ existe una diferencia significativa ($p > 0.01^{**}$) y una aparente correlación con la presentación de las lesiones pulmonares.

SUMMARY.

In this study the results and possible relationship among pulmonary lesions, serum antibody (Ab) production and the number and phenotype of T cell subpopulations in the pig lung after infection with *M. hyopneumoniae*. The purpose of this work was to follow the onset and development of the pulmonary immune response in experimentally infected pigs. Twelve one month-old pigs were intratracheally inoculated with a lung homogenate containing *M. hyopneumoniae* on days 1, 4, 8, 12, 16 and 20 postinoculation. Control animals were sacrificed. The control pigs were intratracheally inoculated with Fris medium only. The animals were necropsied and samples collected from lesions of lung were tested by direct immunofluorescence test (IFA). The histopathological study of the samples was carried out on haematoxylin-eosin stained slides. *Mycoplasma hyopneumoniae* was isolated from the samples and identified by the growth inhibition test. The samples were also used to study the type and number of cell infiltration in the tissue by immunohistochemistry with monoclonal antibodies against CD4+ and CD8+. The positive cells were counted and the density of cells (cells count/ unit area) was obtained using a computer assisted image analyzer. The serum of each animal was evaluated by the use of ELISA Tween 20 test. The inoculated pigs showed lesions at the cranial and caudal lobes. The macroscopic lung lesions were evident from day 4 P.I. reaching up to 11.4% of the total lung surface area. These lesions were positive to IFA from day 8 onwards and *M. hyopneumoniae* was isolated from all the inoculated pigs. The animals were positive to ELISA Tween 20 test before day 12. The pathological study showed the characteristic development. Lymphocytes with CD4+ marker showed preferential per bronchial and per bronchiolar accumulation. The peak of cellular increment was observed on day 8 P.I. At that time was also an observed increase of plasma cells, coinciding with an increase in circulating antibodies as measured by the ELISA test. The CD8+ cells showed no particular distribution or concentration in the tissue but were found always in greater number than CD4+ cells and showed a significant increase on day 8 P.I. On day 12 areas of lung consolidation were observed coinciding with the observation of other cells such as polymorphonuclear cells and macrophages. On day 20 P.I. there was a high number of CD8 cells and also a high degree of pulmonary lesions. It is concluded that *Mycoplasma hyopneumoniae* increased significantly CD4 and CD8 lymphocytes in the first days of the infection.

1. INTRODUCCION.

1.1 Antecedentes.

Las pérdidas económicas que originan los problemas respiratorios del cerdo son una preocupación mundial. Existen datos que indican que al afectarse el tejido pulmonar, se reduce el crecimiento corporal del cerdo. Se estima que por cada 1 % de pulmón afectado por neumonía enzoótica se reduce el crecimiento del animal 2.2 grms. por día. La combinación de días adicionales al mercado, ineficiencia alimentaria, decremento de la ganancia diaria de peso e incremento de la mortalidad origina la pérdida estimada de \$3.80 a 5.70 dólares por cada animal (Christansen 1990, 1995, Clark, 1996). La investigación actual está enfocada a comprender las diversas enfermedades respiratorias tales como la pleuroneumonía contagiosa porcina, la neumonía enzoótica, la pasteurelisis pulmonar y la rinitis atrófica, para así controlarlas adecuadamente. Se reconoce que la Neumonía Enzoótica (NE) es una enfermedad de importancia en la producción porcina, por su alta incidencia (75%) lo que implica elevadas pérdidas económicas (Armstrong 1994, Hogg, 1996).

1.2 Características Generales de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

El *Mycoplasma hyopneumoniae* es el agente etiológico primario de la Neumonía Enzoótica. Cuando este microorganismo está ausente en los cerdos de crecimiento y finalización, el daño económico es menor, la importancia del micoplasma puede ser sobreevaluada si se considera que esta bacteria por sí sola puede causar neumonía, pues es una enfermedad de origen multifactorial clásica, con típicos signos clínicos y alteraciones patológicas en el pulmón (Hannan *et al*, 1984, Ross, 1996).

La posibilidad de que un micoplasma estuviera involucrado en la etiología de la Neumonía Enzoótica fue investigada por dos grupos simultáneamente: uno en Iowa, en E.U. 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. suisneumoniae*, posteriormente, mediante la prueba de inhibición metabólica, se demostró que eran metabólicamente y serológicamente idénticos. El Comité de Nomenclatura de Micoplasmas dio prioridad al uso de *M. hyopneumoniae* (Armstrong 1981, Pijoan 1982, Christensen 1992).

Mycoplasma hyopneumoniae se adhiere al epitelio respiratorio tanto *in vivo* como *in vitro*. Se ha demostrado que puede atacar fibroblastos pulmonares humanos, células de riñón porcino y glóbulos rojos de pavo, localizándose una adhesina de *M. hyopneumoniae* designada como P97 la cual ha sido clonada, secuenciada e identificada su unión al cilio. (Hsu *et al.*, 1997).

Actualmente se reconocen dos tipos de cepas por anticuerpos monoclonales, por lo que se han descrito dos secuencias de DNA con 1550 bp mediante pruebas de hibridación (Simecka, 1992).

1.3 Antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae*

El análisis antigénico de los micoplasmas es extremadamente difícil, debido al pequeño volumen de microorganismos que se obtienen *in vitro*, de 5 a 20 mg por litro de medio de cultivo. (Ciprián, 1979). Los estudios sobre la naturaleza química de los antígenos de micoplasmas han sido realizados por varios autores y los resultados encontrados revelan que existen antígenos proteicos, glicolípidos y polisacáridos (Tryon and Baseman, 1992).

Se han comparado cepas de *M. hyopneumoniae*, encontrando 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 (Ro y Ross, 1983). Existe una respuesta contra un gran número de proteínas de membrana de *M. hyopneumoniae*, así como proteínas con características de adhesinas o citolíticas, que pudieran estar involucradas en la patogenia de la enfermedad.

En la búsqueda de un buen inmunógeno se realizaron pruebas de inmunotransferencia, con el fin de detectar las principales proteínas del micoplasma a las cuales responde el cerdo.

Esta misma diversidad antigénica se encontró también utilizando la técnica de inmunotransferencia con las siguientes cepas de micoplasmas porcinos: *M. hyopneumoniae* cepa J y 194, *M. flocculare* cepa Ms 42 y *M. hyorhinis*, y los sueros de animales convalecientes de *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* y antisuero porcino de *M. flocculare*. Se detectaron cinco antígenos comunes, estimando sus pesos moleculares en : 110, 64, 50, 41 y 36 kD. El único antígeno de *M. hyopneumoniae* que no

cruzó con los otros micoplasmas mencionados fue el de 64 kD, el cual puede ser utilizado como antígeno específico para el diagnóstico de *M. hyopneumoniae* (Young y Ross, 1987). En otro trabajo, utilizando lavados bronquiales de cerdos inoculados con *M. hyopneumoniae*, cepa 232 y mediante la técnica de inmunotransferencia se detectaron anticuerpos que reconocieron varios antígenos, siendo de especial interés el antígeno de 97 kD, ya que fue el primero en detectarse por anticuerpos IgA e IgG a partir de los 35 días postinfección (Young, *et al.*, 1990).

A las dos semanas postinfección aparecen tres proteínas cuyos pesos moleculares son de 33, 47 y 53 kDa, que posiblemente están involucradas con la virulencia del micoplasma (Strasser *et al.*, 1992). En sueros de animales vacunados se tienen anticuerpos para la lipoproteína P65 la cual es considerada como un importante inmunógeno (Klinkert, 1985).

En resumen, parece ser que el cerdo reconoce principalmente a las lipoproteínas 65 Kd, 50 Kd y 44 Kd tanto por SDS-PAGE e inmunotransferencia y que un buen inmunógeno que contenga estas proteínas garantiza su eficiencia (Tacker, 1998).

Se ha aislado e identificado un factor citopático de *M. hyopneumoniae* a partir de membranas de la cepa VPP 11, que es una proteína con un punto isoeléctrico de 6.2, peso de 54 kD, capaz de inducir efecto citopático en fibroblastos de pulmón humano (MRC-5) (Geary y Walczak, 1985 a y b).

Con respecto al fenómeno de adhesión se ha demostrado que existe la proteína 97 Kd, la cual facilita la adherencia de *M. hyopneumoniae* al cilio y al utilizar anticuerpos monoclonales contra P97 se previene la adherencia al cilio "*in vitro*" (Hsu and Minion, 1998).

1.4 El sistema inmune celular del aparato respiratorio del cerdo.

Los componentes más importantes de la defensa respiratoria pulmonar de tipo celular comprenden: fagocitos (macrófagos alveolares y vasculares, histiocitos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos), linfocitos B (células plasmáticas) y linfocitos T (linfocitos cooperadores, supresores, linfocitos citotóxicos o asesinos naturales) (Christensen *et al.*, 1999).

El aparato respiratorio del cerdo se divide en su parte superior o anterior en nariz, faringe, laringe y tráquea. Las bacterias u otros microorganismos primero se deben confrontar con el aparato

mucociliar de las vías respiratorias de bronquios y bronquiolos los cuales atrapan al patógeno y lo expulsan a la cavidad de la nasofaringe. Los antígenos granulares pueden llegar al pulmón via bronquial o sanguínea. El cerdo tiene para ambos sitios protección a través de los macrófagos. Los macrófagos alveolares neutralizan todo material extraño que escapa de las defensas del aparato mucociliar. Pueden existir neutrófilos de la sangre que invaden el alveolo y apoyan a los macrófagos en su actividad fagocítica. En un cerdo sano los parámetros de los elementos celulares en el moco broncoalveolar es de 70-80% de macrófago alveolar, 11-18% de linfocitos, 8- 12% de neutrófilos y 5% de eosinófilos (Roth, 1999).

El sistema fagocítico también comprende macrófagos intravasculares los cuales son particularmente numerosos en el cerdo en el pulmón así como histiocitos con propiedades fagocíticas en tejido conectivo (Christensen *et al.*, 1999). Un incremento en granulocitos es un buen indicador de infección en el aparato respiratorio. El pulmón del cerdo, al igual que el ovino, caprino, bovino y canino, limpia más bacterias que el hígado y el bazo. Esto se debe a la existencia de gran número de monocitos, los cuales cubren el 16% de la superficie capilar pulmonar en cerdos de 30 días de edad, en contraste con el 2% en los cerdos recién nacidos (Pabts, 1994). Aunque en pequeño número, los macrófagos intravasculares en capilares pulmonares han sido documentados en el pulmón humano, pero no en roedores. Es de considerable importancia el sistema fagocítico, ya que se considera que el 15% del sistema fagocítico mononuclear del organismo, reside en mucosa respiratoria. (Vega, 1994).

Las células asesinas naturales (NK) difieren de otras especies ya que su actividad es mediada por pequeños linfocitos granulares que tienen el marcador CD2 y su participación dentro de los mecanismos de defensa en la inmunidad celular, depende de la estimulación de citocinas como el interferón gamma e interleucina 2 (IL-2) (Roth, 1999).

La presencia de células B es mayor en el tejido linfoide asociado a bronquios (BALT), siendo en su mayoría productoras de IgA que es de crucial importancia en el sistema respiratorio, en el cual es la inmunoglobulina predominante, y en el aparato inferior que comprende al pulmón, la IgG sobresale de otras inmunoglobulinas en secreciones y en algunas ocasiones se genera IgE como respuesta a parásitos, como por ejemplo contra la fase larvaria de *Metastrongylus spp* (Stevenson, 1999).

La inmunidad mediada por células se realiza a través de linfocitos T cooperadores (CD4) y citotóxicos (CD8) principalmente. Cuando los linfocitos son marcados e inyectados por vía intravenosa ocurre una gran concentración de estas células en el pulmón del cerdo poco tiempo después. En el pulmón del cerdo joven la cantidad de linfocitos intravasculares es considerable (1.5×10^9), esta cantidad es varias veces superior a la encontrada en los vasos del hígado y riñón. La adhesión por moléculas no específicas es responsable de la marginación de los linfocitos en el pulmón. Hasta un 50% de las células en el intersticio pulmonar son linfocitos que circulan constantemente y en forma bidireccional del espacio intravascular al intersticial y de ahí al brocoalveolar, para finalmente llegar a los linfonodos regionales y de ahí volver a la sangre (Fig 1) (Pabst, 1992).

Los linfocitos pueden ser obtenidos y caracterizados por lavado traqueobronquial (BAL). Se tienen pocos datos sobre el número total presente en la mucosa bronquial o en el intersticio. Cerca del 10% de las células nucleadas obtenidas son linfocitos y se sabe poco de los factores que regulan su entrada al espacio bronquioalveolar en todas las especies, por lo que un aspecto interesante es establecer las cantidades normales de linfocitos en el aparato bronquioalveolar (Morilla, 1997).

Se ha descrito la distribución celular en tejido linfoide asociado a la cavidad nasal en el ratón (NALT) por Kupper *et al.*, (1992). Así mismo Huang *et al.*, 1990, han descrito la distribución del BALT en el pulmón del cerdo. En otras especies (por ejemplo el hombre o la rata) la población de los linfocitos intersticiales es similar al número existente en la sangre periférica. Se desconoce el papel de los linfocitos de la sangre en la organización del tejido linfoide del pulmón, así como del tejido linfoide asociado a bronquiolos (BALT).

En cuanto al tejido linfoide asociado a bronquios (BALT) en el cerdo es similar a ratas y conejos (Fig. 2). El BALT se encuentra en todos los animales hoy estudiados. En humanos, sin embargo, el BALT no se encuentra en un pulmón sano (Roth, 1999). En cerdos el BALT no es una estructura linfoide como ocurre en aves y en animales SPF. El epitelio que cubre la zona de los folículos linfoides en el bronquiolo pulmonar ha sido estudiado por microscopía electrónica, existiendo algunas similitudes con el epitelio especializado de las placas de Peyer que ha sido descrito y estudiado ampliamente (Huang *et al.*, 1990, Tizard, 1998).

El estatus microbiano del pulmón es importante para el desarrollo del BALT en el cerdo. Varios estudios han definido al BALT como siempre presente bajo condiciones de la granja y sus efectos

ante la estimulación molecular. La investigación del BALT es importante dada su participación en la captación de antígeno y su intervención en la respuesta inmune protectora del pulmón (Huang et al.,1990).

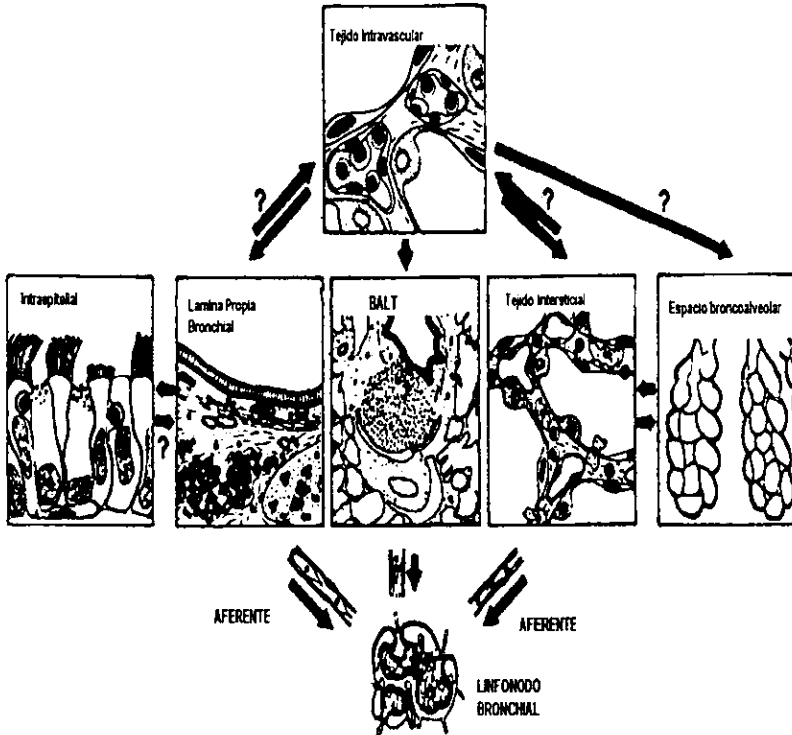


Fig.1. Esquema de la localización de los linfocitos en diferentes compartimientos del pulmón porcino y las rutas de migración entre estos compartimientos (Modificado de Pabst,1994).

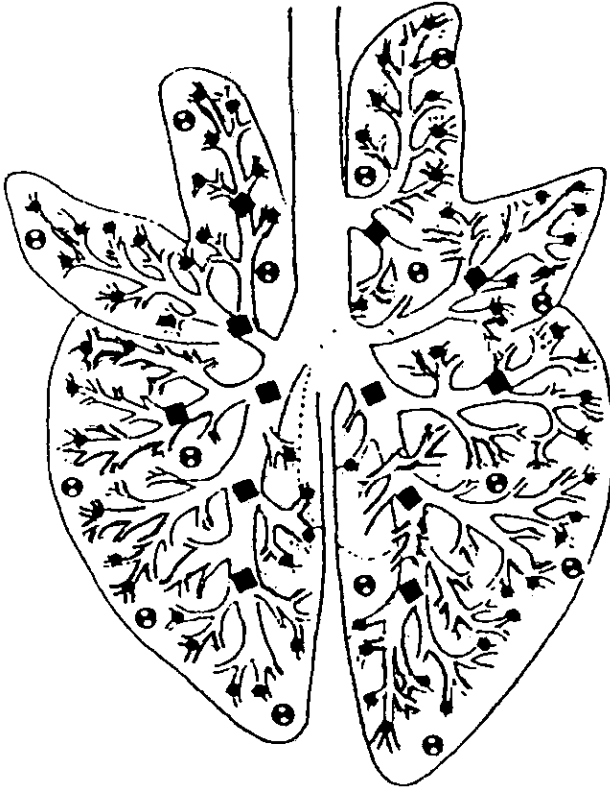


Fig. 2. Representación esquemática de la distribución anatómica del tejido linfoide asociado a mucosas de las vías intrapulmonares del cerdo (BALT), el bronquio (■), bronquiolo (●) y bronquiollillo respiratorio (⊗) (Modificado de Huang, 1990).

1.5 Características Generales de las Micoplasmosis Respiratorias.

Realizando una breve revisión de las enfermedades micoplasmiales del hombre y los animales, se observan muchas similitudes, en sus mecanismos de patogenicidad y los hallazgos patológicos, los cuales se resumen en el Cuadro 1.

1.6 Inmunopatogenia de los micoplasmas

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. Se conocen hasta el momento una serie de eventos que se suceden, siendo estos los que a continuación se describen en el Cuadro 1.

Existe primero una interacción entre *M. hyopneumoniae* y los mecanismos de respuesta inmune células específicas localizados en pulmón, como los macrófagos alveolares y los linfonodos 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 postinfección. 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 linfonodos retrofaríngeos cambiando esta proporción a 1:15 en linfonódulos bronquiales. En estos nódulos, a las tres semanas postinfección se encuentra 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 la IgA va incrementándose progresivamente (Suter *et al.*, 1985).

Los anticuerpos séricos tienen un comportamiento diferente al observado en las secreciones traqueobronquiales. Estos anticuerpos se detectan a las 5 semanas postinfección, siendo las IgG las más importantes (Lam, Switzer, 1971 a y b; Etheridge *et al.*, 1979 b; Lloyd *et al.*, 1984).

CUADRO 1. Características de las Enfermedades Respiratorias Micoplasmales

	Neumonía Atípica (Humano)	MRM	CCPP	Neumonía Enzootica	CRD
Lesiones en aparato respiratorio superior	Si	Si	No	No	Si
Hiperplasia epitelial	Si	Si	No	Si	Si
Lesión pulmonar inicial	Bronquios Bronquiolos?	Alveolo (ratón) Bronquio Bronquiolo (rata)	Alveolo	Alveolo?	Vías Respiratorias
Hiperplasia linfoide	Si	Si	únicamente en la forma crónica	Si	Si
Incremento de macrófagos	Si	Si	No	Si	Si
Exudación neutrofílica	Mínima	Extensiva en ratón	Mínima	Si	Si
Involucramiento de otros órganos	Si	Si	Si	No	Si

MRM: Micoplasmosis Respiratoria Murina, CCPP: Pleuroneumonía Contagiosa Caprina
 CRD: Enfermedad Crónica Respiratoria de pollos y pavos.

Razin, 1985

Las pruebas de ELISA y fijación de complemento son las más 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 aplicaciones en el monitoreo de hatos, particularmente en la detección de anticuerpos aunque éstos no confieren protección (Djordjevic et al., 1997). En un experimento comparando cuatro vacunas, no se encontró correlación entre el título de anticuerpos y la severidad de las lesiones (Tacker et al., 1996).

La respuesta inmune a micoplasmas parece ser similar a la inducida por microorganismos extracelulares. Sin embargo, ocurren diferencias en la naturaleza y magnitud de la respuesta inmune según la patogenicidad o virulencia de la especie de micoplasma y sus cepas (Simecka et al, 1992) (Cuadro 2)

Una característica común de las infecciones por micoplasmas es la tendencia a infectar superficies mucosales y producir frecuentemente una enfermedad subclínica en estos sitios. La infección puede ser confinada a la mucosa, esto ocurre con *M. pneumoniae* en el hombre, *M. hyopneumoniae* en cerdos y *M. dispar* en cabras, donde el sitio de ataque es el epitelio ciliado del aparato respiratorio. Otros micoplasmas son más invasivos y pueden localizarse en otros sitios. Ejemplos de especies invasivas son *M. bovis* en bovino, *M. agalactiae* y *M. capri* en cabras y *M. pulmonis* en roedores. La habilidad para dañar las defensas del huésped, así como reducir el efecto la fagocitosis y el complemento, pueden ser importantes en determinar la virulencia y la persistencia de los micoplasmas (Mc Garrity, et al.,1992).

Los mecanismos inmunes locales son estimulados como consecuencia de estas infecciones mucosales y la especificidad de los anticuerpos producidos en las secreciones se ha encontrado predominantemente IgA e IgG (Djordjevic, et al., 1997).

En la infección de *Mycoplasma hyopneumoniae* la respuesta inmune celular ha sido medida por las técnicas de transformación blastoide y la de hipersensibilidad cutánea (Roberts, 1972), encontrándose una respuesta significativa a las dos pruebas hasta por un período de 44 a 66 semanas post-inoculación, así mismo se ha detectado que existe una alteración en la función del macrófago alveolar e inmunosupresión en los cerdos infectados (Caruso ,1990, Tajima,1983). También se han encontrado anticuerpos contra las glicoproteínas de membrana de los eritrocitos de

cerdo después de una infección experimental con *M. hyopneumoniae*, sugiriendo la posible asociación de la enfermedad con fenómenos autoinmunes en la patogénesis de la enfermedad.

Por otro lado se ha observado que los animales recuperados desarrollan una fuerte inmunidad a la enfermedad ya que, cerdos experimentalmente expuestos no desarrollan neumonía cuatro meses después de la primera infección. 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).

La patogenia de la micoplasmosis mantiene diversas interrogantes ¿porque la infección se limita a mucosas? ¿ cómo es posible que los microorganismos más pequeños dentro de las bacterias produzcan tanto daño? ¿por qué la especificidad de la especie afectada?

Los micoplasmas son un grupo de microorganismos libres, sin pared celular, con genoma pequeño (500 MDA o 750 kbp). Debido a sus capacidades biosintéticas limitadas, los micoplasmas requieren un medio de cultivo complejo o una relación parasítica con las células animales (Tryon, et al., 1992).

Los micoplasmas son los procariones más pequeños capaces de replicarse por si mismos y causar una gran variedad de enfermedades. Pueden inducir efectos en la célula eucariótica por decremento en su desarrollo o por competencia por los nutrientes, afectar su metabolismo, por liberación de toxinas, interactuando con receptores o induciendo la expresión de receptores. La modulación de la respuesta inmune del huésped a los micoplasmas está pobremente definida especialmente para los micoplasmas de interés veterinario (Mc Garrity, et al., 1992).

También se ha demostrado un factor de inmunosupresión que ha sido llamado Factor de Supresión de *Mycoplasma* (FSM). (Kishima and Ross, 1985 ; Tajima, 1983 ; Suter et al., 1985).

Se ha señalado que muchas especies de micoplasmas poseen cualidades potenciales para inducir una supresión no específica de la respuesta inmune (Adeboye, 1978) o efectos citopáticos por acción de sus superantígenos (ej. *M. arthritis*) o por una activación policlonal de linfocitos B como *M. hyorhinis*, o de células T como *M. arthritis*, que contribuyen a las manifestaciones inmunopatológicas observadas en ciertas infecciones por micoplasmas. Sin embargo, algunos poseen la capacidad de activar complemento, suprimir las funciones de los macrófagos y neutrófilos e inducir citocinas. (Romero, 1998). Recientemente ha sido sugerido el papel de los micoplasmas en la patogenicidad del SIDA (Blood, 1997). Con la excepción del superantígeno de la proteína MAM

secretada por *M. arthritis*, los eventos inmunomoduladores de otras especies no han sido bien caracterizados.

Los micoplasmas se caracterizan por colonizar membranas mucosas, producir enfermedades crónicas respiratorias, genitourinarias y enfermedades en articulaciones tanto en el hombre como en los animales (Feldner, 1982). El género *Mycoplasma* tiene diversos efectos sobre células de mamífero *in vitro*, particularmente sobre células del sistema inmune dentro de las cuales están la activación o supresión de la función de linfocitos y macrófagos, lo que contribuye a la inflamación y cronicidad de las enfermedades producidas por estos organismos (Cole y Atkin, 1991).

El desarrollo de la investigación de los micoplasmas porcinos ha tenido varias etapas, el establecer que el micoplasma era el causante de la neumonía enzoótica, después conocer sus mecanismos de patogenicidad, establecer los principales epitopes presentes que son reconocidos por el cerdo, cómo realiza su adhesión a las células pulmonares, la participación de la respuesta inmune humoral y el comportamiento de las inmunoglobulinas en el aparato respiratorio. Se ha observado que *M. hyopneumoniae* destruye los cilios del cerdo y produce sustancias citotóxicas y que *M. hyorhinis* produce peróxido de hidrógeno (Ciprian *et al.*, 1994).

Hace unos años el estudio de la respuesta celular por el método de citofluorometría, a partir de tejidos como el pulmón, bazo, linfonodos y sangre periférica, demostró un incremento de células CD8+ y CD4+ en linfonodos bronquiales, llamando la atención el aumento significativo de las células CD8+ y un incremento de las células CD16 (Fcr III). Este último marcador aparece predominantemente en macrófagos, células NK y monocitos y está involucrado en la producción de superóxido durante la inmunofagocitosis y en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Boghal *et al.*, 1994, Dayalu and Ross, 1990).

CUADRO 2. Respuesta celular en infecciones por micoplasmas

Organismo	Huésped	Transformación Linfocitaria	Hipersensibilidad retardada	Inhibición de la migración de macrófagos
<i>M. pneumoniae</i>	Hombre	+	+	+
	Hamster	-	+	
	Cobayo	+	+	
<i>M. mycoides</i> <i>Subs. mycoides</i>	Bovino	+	+	+
<i>M. hyopneumoniae</i>	Cerdo	+	+	+
<i>M. hyorhinis</i>	Cerdo		+	
<i>M. arthritis</i>	Ratón	+		
	Conejo	+		
	Rata	+		
<i>M. pulmonis</i>	Ratón	+	-	-
	Conejo	+		
	Rata			+
<i>M. conjunctivae</i>	Cabra	+		
<i>M. bovis</i>	Bovino	+		
<i>M. hominis</i>	Mono	+		
	Hombre	+		
<i>U. urealyticum</i>	Hombre	-		
<i>M. synoviae</i>	Pollo	+		+
<i>M. canis</i>	Cobayo			+
<i>M. fermentans</i>	Hombre			+

Razin, 1985.

Se han propuesto varias teorías acerca de los procesos que implican a *M. hyopneumoniae* para producir daño, dentro de las cuales se encuentra el desarrollo de complejos inmunes, o un proceso de hipersensibilidad retardada o de autoinmunidad (Tizard, 1998). La posibilidad de explicar lo que sucede apareció cuando se dio a conocer la existencia de los llamados superantígenos, que son un grupo de proteínas bacterianas (toxinas) producidas por *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* las cuales producen una potente estimulación sobre las células T. Dentro de estas proteínas se ha caracterizado un mitógeno de células T, conocido como MAM segregado por *Mycoplasma arthritis*, el cual causa artritis en las ratas y se le ha implicado en inducir una respuesta autoinmune (Purdie, et al., 1991; Cole y Atkin, 1991).

Ya que la neumonía enzoótica es crónica y que *M. hyopneumoniae* produce una reacción autoinmune al producir anticuerpos contra el pulmón (Pijoan, 1992, Tizard, 1998), es posible que exista algún superantígeno.

También se han detectado factores tanto de estimulación linfocitaria en la membrana de *M. hyopneumoniae* como factores de supresión linfocitaria, como el denominado MSF (mitogen-suppressing factor) que se cree sea el responsable de la infiltración linfocitaria observada en las lesiones neumónicas (Kishima y Ross, 1985). Para confirmar que *Mycoplasma hyopneumoniae* era el agente causal de la neumonía enzoótica, se realizaron inoculaciones intranasales e intratraqueales con cultivos del agente en animales gnotobióticos, así como en animales SPF de granjas libres de neumonía enzoótica (Betts, 1972, Minitts, 1982).

Sin embargo, en muchas ocasiones a pesar de que desarrollaban lesiones pulmonares, estas no reflejaban a las encontradas en los casos clínicos, descartando también el uso de cerdos gnotobióticos debido a que estos animales son susceptibles a la enfermedad. Posteriormente se encontró que la inoculación de homogeneizados pulmonares con *M. hyopneumoniae* intratraquealmente, producía con mayor regularidad las lesiones neumónicas características y se recuperaba con mayor frecuencia al micoplasma (Brassine et al., 1977, Goodwin 1965, 1971, Hodges et al., 1969).

Hannan et al., (1984) establecen un modelo experimental estandarizado para la replicación de la enfermedad. Este método, a pesar de haberse desarrollado para cerdos gnotobióticos puede emplearse en cerdos SPF. El ensayo se basa en el uso de homogeneizados pulmonares

obtenidos por inoculaciones alternadas de cultivo y homogeneizados pulmonares. Este método es utilizado actualmente por varios autores con el objeto de evaluar agentes quimioterapéuticos, vacunas y la patogenia de la enfermedad. Ross, *et al.*, (1984) al usar homogeneizado pulmonar, establecen la determinación del número de micoplasmas inoculados mediante la determinación de las unidades cambiantes de color (UCC) por mililitro, en cuanto a las lesiones macroscópicas establecen el número de lóbulos que presentan lesión del total examinado, así como el porcentaje de la lesión neumónica mediante un sistema analizador de imágenes y la determinación de la infectividad del agente la establece por inmunofluorescencia, aislamiento del micoplasma así como la producción de anticuerpos.

Los estudios de estimulación o supresión linfocitaria se han realizado con células o membranas de *M. hyopneumoniae*, pero no con proteínas que se pudieran encontrar en los sobrenadantes de los cultivos tal como ocurrió con *Mycoplasma arthritis* (Cole y Atkin, 1991; Bekof *et al.*, 1987), donde las proteínas de los sobrenadantes fueron caracterizadas y aplicadas en ratones para observar los efectos de artritis. Cuando se realizaba la investigación en busca de un inmunógeno eficaz contra la neumonía enzóotica, se encontró curiosamente, que el inmunógeno obtenido de sobrenadantes era el que mejor inducía protección (Ross *et al.*, 1984). Recientemente, se encontró que en los sobrenadantes existían una serie de proteínas que tenían características citolíticas y hemolíticas y que una de estas proteínas solo era reconocida por los animales infectados y no por los animales vacunados con inmunógenos comerciales elaborados con células completas (Díaz *et al.*, 1996).

En otros estudios se observó que fluidos de lavado bronquioalveolar de cerdos experimentalmente infectados con *M. hyopneumoniae*, suprimieron la respuesta quimioluminiscente de neutrófilos porcinos, este efecto supresor se correlacionó significativamente con la concentración de prostaglandina E2 (PGE2) en el fluido, además, la PGE2 humana purificada produjo el mismo efecto y los niveles altos de PGE2, que siguen a la infección de *M. hyopneumoniae*, pueden ser responsables de la supresión de la actividad de los polimorfonucleares en las vías aéreas del cerdo y esto puede llevar a la exacerbación de infecciones secundarias en el pulmón (Asai *et al.*, 1994 y 1996).

La participación de agentes infecciosos en la activación de elementos bioquímicos capaces de alterar el funcionamiento de otras células distintas de los linfocitos T o B, tales como los polimorfonucleares y macrófagos, permite entender mejor la patogenia de las infecciones. Así por

ejemplo, para el caso de *M. bovis*, la activación del choque respiratorio mediado por neutrófilos, es inhibida por la activación de la proteína quinasa C (PKC) y está mediada directamente por la interacción de *M. bovis* sobre la membrana de los neutrófilos (Thomas *et al.*, 1991).

Al determinar los mecanismos del daño pulmonar por *Pasteurella haemolytica* en bovinos, se encontró que el LPS puede dañar directamente las células endoteliales y que los efectos tóxicos pueden ser reducidos por neutrófilos, sin embargo los neutrófilos muertos por la leucotoxina bacteriana pueden contribuir al daño de las células endoteliales en ausencia del LPS (Breider *et al.*, 1991).

Los granulocitos y monocitos son capaces de dañar al hospedero por la liberación de ciertas citocinas, mediadores inflamatorios y proteínas, en la infección por el virus de la fiebre porcina clásica. Las células monocíticas (SWC3+ SWC8-) y las granulocíticas (SWC3+ SWC8+) infectadas, pueden causar daño a células endoteliales y hemorragias petequiales (Summerfiel *et al.*, 1998). Para fundamentar la teoría del superantígeno se tendría que establecer cual de estas proteínas es supresora o estimuladora de los linfocitos y detectaría en el pulmón en el proceso activo de la enfermedad, así como inocularla a cerdos sin la participación de células de *M. hyopneumoniae* y observar si los cambios celulares que los mismos a los de una infección natural.

1.7 Poblaciones de linfocitos T en el cerdo.

Los linfocitos del cerdo son altamente heterogéneos en su superficie y en su comportamiento biológico *in vitro* e *in vivo*. Tomando estas propiedades se definen una serie de subpoblaciones de linfocitos cuyo origen, desarrollo, maduración y papel inmunológico son actualmente objeto de un esfuerzo considerable de investigación (Cruce and Lewis, 1994). Gran parte de ese trabajo se ha hecho en linfocitos sanguíneos de cerdos jóvenes, ya que este tejido probablemente contiene la más amplia variedad de tipos de células maduras y en desarrollo, y puede ser muestreado repetidamente en cerdos manipulados experimentalmente o normales. La sangre de los cerdos jóvenes (de tres a cuatro meses de edad) contiene alrededor de 10^7 linfocitos por ml., de los cuales en la mayoría de los animales, entre el 10 y 20% corresponden a la línea B, del 40 al 70% a células formadoras de rosetas E de la línea T y entre el 30 y el 40 % a linfocitos Null, altamente timo dependientes (Binns, 1995).

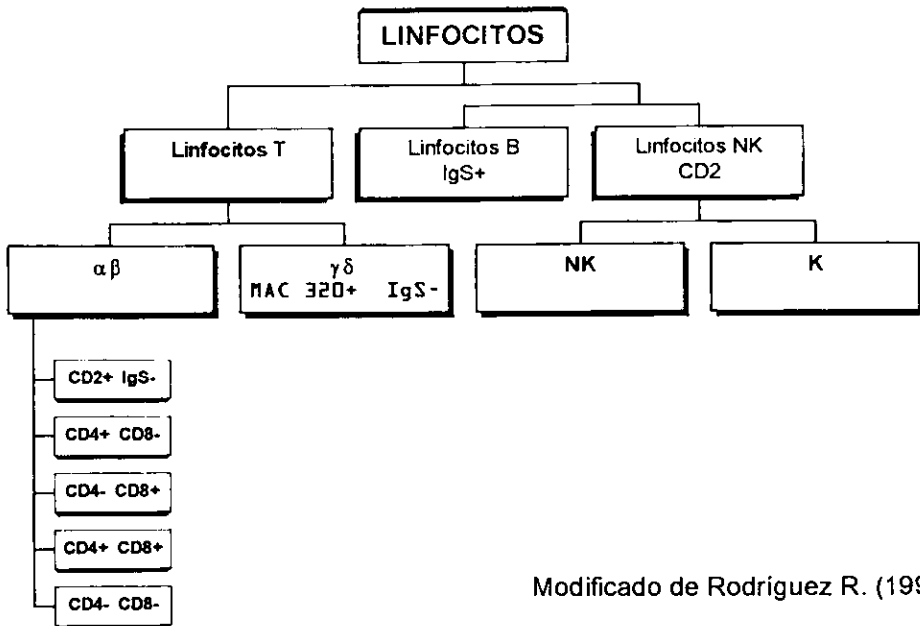
Los leucocitos de los cerdos tienen seis proteínas de superficie que no se han encontrado en otras especies. La mayor parte de los leucocitos, células T en reposo, monocitos y granulocitos expresan SWC1, pero no las células B, este disminuye cuando se activan las células T. Una característica única de los cerdos es que poseen una gran proporción de células CD4⁺ CD8⁺ en la sangre periférica (hasta 60%). Estos linfocitos T, doblemente positivos, no expresan el receptor IL-2, CD25 y quizá representan un grupo de células T de memoria. El cociente de células CD4/CD8, que alcanza 1 a 1.5 en otros mamíferos, es de apenas 0.6 a 0.36 en el cerdo. Las células T doblemente negativas (CD4⁻CD8⁻) también constituyen una proporción relativamente alta de la población de linfocitos T (entre 40 y 50%)(figura 3). Estos se subdividen en un subgrupo CD2⁺ y otro CD2⁻. (Tizard, 1998).

Como resultado de la reunión de trabajo denominada Second International Swine CD Work Shop, se agregaron los siguientes CD : CD2a, CD4a, CD5a, WCD6, WCD8, CD14, CD18a, WCD21, WCD25. Lo más importante fue la identificación de 5 nuevos antígenos CD porcinos, denominados CD3 (reconocido por 6 nuevos anticuerpos monoclonales de los cuales se reconocen 3 epitopes), CD16 (un nuevo anticuerpo monoclonal) WCD (2 anticuerpos monoclonales).

La existencia de linfocitos doble positivos (CD4⁺ CD8⁺) es un hecho particular en cerdos. Existe evidencia de que estas células pueden ser estimuladas por antígenos virales y que las poblaciones de linfocitos doble positivos son heterogéneos y constituyen parte de las células de memoria. Un grupo de moléculas han sido identificadas como moléculas marcadoras CD45 y CD29. (Zuckerman, 1994).

En tejidos como el intestino ya se ha estudiado la distribución de las células CD2, CD4, CD8, células accesorias (monocitos/granulocitos, clase II del MHC (DRw) y el receptor de interleucina IL-2 (Vega-López *et al.*, 1993) que puede estar relacionada con la fisiología del sistema inmune mucosal. Sin embargo, en el aparato respiratorio del cerdo no han sido efectuadas investigaciones semejantes, que serían de gran ayuda para comprender la maduración y cinética de las poblaciones de células T en condiciones normales.

Figura 3. Subpoblaciones de linfocitos en el cerdo



Modificado de Rodriguez R. (1998)

1.8 Diagnóstico de la Neumonía Enzoótica.

La neumonía por micoplasmas se diagnostica normalmente bajo condiciones prácticas, con base en la presencia de una neumonía crónica en la pira, tos no productiva y sin fiebre, neumonía que se caracteriza por una tos bien demarcada y explosiva, con hallazgos histológicos de neumonía intersticial que produce crecimiento disparejo, conversión alimenticia deficiente y sin mortalidad. Sin embargo, estos signos son sólo indicativos y la confirmación mediante pruebas de laboratorio es esencial para el diagnóstico cuando se van a introducir animales de otras pira a una granja no infectada. Las pruebas de laboratorio comprenden diferentes procedimientos (Ross, 1990, Kenny *et al.*, 1992).

Inmunofluorescencia : Consiste en el examen del pulmón utilizando un conjugado policlónico o poliespecífico anti *M. hyopneumoniae*. La especificidad de esta prueba (conocida también por sus iniciales IFA) es ambigua, puesto que *M. hyopneumoniae* comparte propiedades antigénicas con *M. flocculare* y *M. hyorhinis* (Giger, 1977 y Schuller, 1977).

Cultivo: El análisis mediante cultivo de muestras de pulmón con una identificación subsecuente de los aislamientos utilizando: epifluorescencia, inhibición de crecimiento, inmunotransferencia para detectar la proteína p36, prueba de la sonda de ADN y PCR, o reacción en cadena de la polimerasa. El método de cultivo es tedioso y tardado debido a que *M. hyopneumoniae* crece muy lentamente, además del efecto de confusión que producen otros micoplasmas u otras bacterias presentes en el aparato respiratorio (Armstrong, 1994).

Técnicas de biología molecular: La detección de micoplasma con la sonda específica de ADN en muestras clínicas (en lavados traqueobronquiales o en pulmones) es rápida, pero no es suficientemente sensible. La técnica de PCR, desarrollada recientemente, incrementó significativamente la sensibilidad. Al mismo tiempo, reveló la existencia de heterogenicidad entre las cepas. Sin embargo, la prueba diagnóstica de PCR no ha logrado convertirse en una prueba de rutina para el diagnóstico de la infección, pese a sus grandes ventajas, como son el hecho de evitar

el cultivo del micoplasma, de no ser afectada la muestra por el efecto de los antibióticos y otras bacterias presentes en las muestras, la obtención del resultado en poco tiempo, aún antes de que haya una respuesta serológica, aunque también tiene importantes desventajas, tales como la complejidad del examen, el costo elevado, la presencia de algunos resultados falsos positivos y negativos (Stipkovits,1997).

Serología :La serología también se utiliza para establecer el estado inmunitario de piasas. Para estos propósitos con frecuencia se utilizaban, en un principio, las técnicas de fijación de complemento (Etheridge 1979 b, Lloyd, 1984, Slavick,1981) , de hemoaglutinación indirecta (Lam, 1971) y la aglutinación en látex (Slavick, 1976) , las cuales no resultaron ser suficientemente sensibles . La prueba indirecta de ELISA utilizando un antígeno soluble en Tween 20 (Amstrong 1983, Nicolet y Paroz, 1980, Sands,1982) es muy sensible, sin embargo a menudo se observan reacciones cruzadas con anticuerpos de *M. flocculare* y *M. hyorhinis*. debido a que tienen como proteínas comunes la p74, p53 y las proteínas p73 y p41. Son más específicas las pruebas realizadas con el bloqueo con anticuerpos monoclonales para la técnica de ELISA, utilizando anticuerpos anti p-40 y anti p70 (Feld, 1992). Los anticuerpos se pueden detectar no sólo en el suero sanguíneo(I gG) sino también en el calostro (IgA e IgG) o en el aparato respiratorio (IgA) (Young y Ross,1990, Suter, *et al.*, 1989). En algunos casos también resulta útil la prueba de inmunotransferencia para detectar anticuerpos contra antígenos inmunodominantes de importancia. Es posible demostrar la inmunidad mediada por células mediante pruebas tales como la transformación blastoide (Kristensen *et al.*, 1981, Kishima *et al.*, 1985).

2. JUSTIFICACION.

Mycoplasma hyopneumoniae es el agente etiológico primario de la neumonía enzoótica. A este microorganismo se le ha dedicado una gran cantidad de investigación, y aún así, se considera que esta enfermedad seguirá siendo enigmática hasta el siglo XXI (Ross, 1994).

El conocimiento de la inmunidad mucosal en vías respiratorias de los cerdos, como la dinámica celular y los factores que se liberan durante una infección pulmonar son un campo poco conocido, es por ello que el comportamiento de la respuesta inmune mediada por células T (CD4 y CD8), los cambios serológicos y patología que se produce en la infección experimental por *Mycoplasma hyopneumoniae* se estudió para relacionarla con la patogénesis de la neumonía enzoótica.

3. OBJETIVO GENERAL.

Analizar la respuesta de linfocitos T (CD4 y CD8) en el pulmón, mediante el desafío experimental con *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos libres de enfermedades respiratorias y evaluar su relación con otros parámetros tales como: lesiones pulmonares, histopatología, aislamiento, determinación de anticuerpos por prueba de ELISA Tween 20 y detección del micoplasma por inmunofluorescencia.

2. JUSTIFICACION.

Mycoplasma hyopneumoniae es el agente etiológico primario de la neumonía enzoótica. A este microorganismo se le ha dedicado una gran cantidad de investigación, y aún así, se considera que esta enfermedad seguirá siendo enigmática hasta el siglo XXI (Ross, 1994).

El conocimiento de la inmunidad mucosal en vías respiratorias de los cerdos, como la dinámica celular y los factores que se liberan durante una infección pulmonar son un campo poco conocido, es por ello que el comportamiento de la respuesta inmune mediada por células T (CD4 y CD8), los cambios serológicos y patología que se produce en la infección experimental por *Mycoplasma hyopneumoniae* se estudió para relacionarla con la patogénesis de la neumonía enzoótica.

3. OBJETIVO GENERAL.

Analizar la respuesta de linfocitos T (CD4 y CD8) en el pulmón, mediante el desafío experimental con *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos libres de enfermedades respiratorias y evaluar su relación con otros parámetros tales como: lesiones pulmonares, histopatología, aislamiento, determinación de anticuerpos por prueba de ELISA Tween 20 y detección del micoplasma por inmunofluorescencia.

4. MATERIAL Y METODOS

4.1 Selección de cerdos libres de enfermedades respiratorias.

Se emplearon cerdos entre 4 y 6 semanas de edad de una granja ubicada en el Municipio de Zumpango, Estado de México, los cuales provenían de hembras de más de tres partos o de 2 años de edad. Los cerdos fueron negativos serológicamente a *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Pasteurella multocida*.

Uno de estos cerdos se empleó para la obtención de pulmones negativos y suero para la elaboración del medio de Friis para la producción de biomasa de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

De esta granja se solicitaron 21 cerdos de 4 semanas de edad. Tres para la primera etapa de producción de homogeneizado y diez y ocho para el desarrollo del trabajo final.

4.2 Producción de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

La cepa 194 de *M. hyopneumoniae* fue cultivada en 10 ml. de medio de Friis, incubada 72 hrs., posteriormente se inoculó en 250 ml. y después en 1000 ml. del medio mencionado incubándose por agitación a 37° C, 70 rpm. las células fueron cosechadas por centrifugación a 16,000 xg y se lavaron en solución salina balanceada de Hanks (HBSS) por tres veces. Después se tomó una alícuota para determinar la concentración de proteína por el método de Bradford. El antígeno obtenido fue almacenado en viales estériles a -20 C hasta su uso.

4.3 Producción del homogeneizado pulmonar.

Debido a que el cerdo es el único animal susceptible a *Mycoplasma hyopneumoniae* y la inoculación de suspensión de pulmón con lesiones, denominada homogeneizado pulmonar, el procedimiento de infección experimental fue a inocular un lechón con una suspensión de 10 ml de *M. hyopneumoniae* cepa 194, con un título de 10^4 UCC/ml. (Unidades Cambiantes de Color / ml) por vía endotraqueal con una sonda nasofaríngea, para lo cual el cerdo fue previamente sedado con azaperona (2 mg/kg peso, vía intramuscular) y anestesiado con clorhidrato de metomidato (1.5 mg/kg de peso, vía intravenosa). Este lechón fue observado diariamente y se sacrificó cuando se presentaron signos clínicos de neumonía, aproximadamente a los 20 días, mediante el uso de los mismos medicamentos mencionados y exsanguinación. Se obtuvieron asépticamente los pulmones, se

tomaron muestras para la prueba de inmunofluorescencia, las cuales fueron embebidas en el crioprotector Tissue Tek y congeladas a -20°C . A partir del suero se realizó la Prueba de ELISA Tween 20. De las áreas neumónicas se preparó un homogeneizado pulmonar al 20 % (p/v) en medio de Friis. De este primer pase en cerdo se obtuvo el 1 % de lesión pulmonar y una reacción positiva a la prueba de inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa y reaislamiento al día 20 post inoculación. A partir de esta la lesión neumónica se preparó homogeneizado para efectuar un segundo pase inoculando dos cerdos de la manera antes descrita y sacrificándolos a los 20 días. En el segundo pase los dos cerdos resultaron positivos en la prueba de inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa, reaislamiento y ELISA, uno de ellos presentó un 4 % de lesión pulmonar y el otro aproximadamente 5 % a los 20 días. Con el homogeneizado producido de este segundo pase se inocularon los animales del experimento final.

4.4 Grupos experimentales y diseño experimental.

Se formaron seis grupos experimentales de tres cerdos, de 4 semanas de edad, dos de los cuales fueron inoculados y uno permaneció como testigo. Estos procedían de la granja libre de enfermedades respiratorias y en donde no se vacunaban contra *M. hyopneumoniae*, ubicada en el municipio de Zumpango (Edo.Mex). Los cerdos se mantuvieron en adaptación y observación durante una semana antes de iniciar el experimento. Los cerdos inoculados permanecieron aislados de los animales control, en el bioterio de la Unidad de Posgrado de la FES Cuautitlán (U.N.A.M.). Los grupos formados fueron sacrificados cada 4 días, del día 0 hasta el día 20 posinfección, que es el periodo aproximado de desarrollo de la enfermedad, con el fin de determinar el movimiento de las poblaciones celulares de CD4 y CD8 y su relación con otros parámetros (lesión microscópica, detección del micoplasma por inmunofluorescencia y cultivo, títulos de anticuerpo por la Prueba de ELISA Tween 20) quedando así: Grupo I, sacrificado el día 0, el Grupo II, el día 4, el Grupo III, el día 8, el Grupo IV, el día 12, el Grupo V, el día 16 y el Grupo VI, el día 20. Los grupos de animales incluyeron dos animales infectados y un testigo.

4.5 Inoculación de *Mycoplasma hyopneumoniae*

A cada lechón del grupo inoculado se le administró una suspensión de 10 ml. de *M. hyopneumoniae* cepa 194, con un título de 10^4 UCC/ml por vía endotraqueal con una sonda

nasofaringea, para lo cual el cerdo fue previamente sedado con asaperona (2 mg/kg peso, vía intramuscular) y anestesiado con clorhidrato de metomidato (1.5 mg/kg de peso, vía intravenosa). A los cerdos control solo se les inoculó con 10 ml. de medio de Friis. El día de la inoculación se designó como el día 0. Estos lechones fueron observados diariamente y se les tomó la temperatura por vía rectal en la mañana y se observaron los signos respiratorios de tos y de disnea en agitación. Se sacrificaron dos cerdos al azar cada cuatro días (día 0,4,8,12,16 y 20), mediante el uso de los mismos medicamentos mencionados y exsanguinación. Se obtuvieron los pulmones asépticamente, se tomaron muestras para la prueba de inmunofluorescencia, las cuales fueron embebidas en Tissue Tek. A partir del suero se realizó la prueba de ELISA Tween 20.

4.6 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 de cada 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 sobrepuso el diagrama realizado a un 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).

4.7 Histopatología.

Pequeños fragmentos representativos de los pulmones con lesión se fijaron en formalina al 10%, se incluyeron en parafina para la obtención de cortes de 6 μ de espesor y se tiñeron con hematoxilina – eosina (H.E.), para su análisis histopatológico el estudio se realizó a ciegas, sin saber el tratamiento recibido por el cerdo muestreado.

4.8 Aislamiento e identificación de micoplasmas y pasteurellas.

Se utilizó la técnica descrita por Amstrong(1981) y Ciprián (1978), la cual consiste de los siguientes pasos:

1. Se tomó el pulmón de cerdo con lesiones neumónicas sospechosas y se esterilizó la parte afectada empleando una espátula calentada al rojo vivo, se retiró la parte esterilizada con pinzas y tijeras previamente flameadas.
2. Se cortó un trozo de pulmón de aproximadamente 1 gr de peso y se colocó en un homogeneizador (Ten Broeck) estéril con medio de Friis líquido estéril (3 ml) (VER APENDICE 8 A) y se homogeneizó hasta formar una suspensión.
3. La suspensión se decantó en un tubo estéril de centrifuga y se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos.
4. Se tomaron 0.3 ml del sobrenadante y se efectuaron diluciones logarítmicas hasta 10^{-5} , en tubos que contenían 2.7 ml. de medio de Friis líquido. Se incubaron a 37 °C durante una semana y se revisaron diariamente para observar cambio de coloración (amarillo), que indicara contaminación. Los tubos contaminados se desecharon.
5. De los tubos inoculados se tomó un inóculo con asa de platino y se sembró en medio sólido, estos subcultivos de las muestras se realizaron cada 5 días. Los medios sólidos inoculados se incubaron a 37 °C con una atmósfera de CO₂ al 5% durante una semana mediante el uso de jarra con vela.
6. Los medios sólidos se revisaron diariamente y las muestras contaminadas se desecharon. Las muestras en que se sospechó que había crecimiento de micoplasmas, fueron separadas de las demás para efectuar una serie de subcultivos, con la finalidad de mantener estas cepas viables. Las muestras en medio líquido con crecimiento en suspensión, fueron congeladas a -70°C tomando el cultivo de 48 a 72 hrs. de incubación (fase logarítmica) en cantidades de 1 ml y se le adicionó dimetil sulfoxido (DMSO), hasta lograr una concentración final de 1.5 M o glicerol en una relación 1:1, ya que se ha comunicado que este tratamiento reduce la muerte de las células durante el congelamiento (Razin,1985).
7. Para la identificación serológica se requirió de cultivos de micoplasmas puros, para ello fue necesario hacer una serie de clonaciones. Estas clonaciones se realizaron tomando una colonia del medio sólido con una espátula u hoja de bisturi fina y sembrándola a un medio líquido de Friis, este proceso de clonación se repitió tantas veces como fue necesario para obtener las colonias puras.

4.8.1 Identificación inmunológica de los micoplasmas

Prueba de inhibición de crecimiento (Growth- Inhibition Test GIT). Discos de papel de filtro de 5 mm de diámetro fueron esterilizados en autoclave. Cada disco fue impregnado con una gota del antisero específico de *Mycoplasma hyopneumoniae* elaborado en cerdo, (APENDICE 8C), se colocaron los discos en una caja de Petri estéril y se dejaron secar a 37 °C toda la noche. Después fueron almacenados en un frasco estéril y congelados a -70 °C hasta el momento de su uso.

Cajas conteniendo medio sólido de Friis fueron inoculadas con los cultivos de micoplasmas empleando para ello hisopos y sembrando sobre la placa en tres direcciones tratando de obtener un crecimiento uniforme. Después el inóculo se dejó secar junto al mechero o incubando la caja a 37° C durante aproximadamente 15 minutos. Al secarse la caja se colocaron los discos sobre la superficie del agar y la caja fue incubada por aproximadamente una semana. Una zona de inhibición de crecimiento de 3 a 5 mm. de diámetro alrededor del disco se consideró una reacción positiva por efecto inmune (Friis and Jenssen, 1984, Janson 1974, Kobish, 1982).

4.8.2 Aislamiento e identificación de *Pasteurella multocida*.

Con la finalidad de determinar una posible infección secundaria por *Pasteurella multocida* se consideró necesario establecer su participación durante el experimento. A partir de las lesiones neumónicas, que fueron utilizadas para aislar los micoplasmas, se sembraron simultáneamente placas de agar sangre y se incubaron a 37°C durante 48 hrs. A las colonias aisladas se les hicieron pruebas de identificación bioquímica de acuerdo a los criterios de Cowan y Steel (1974).

4.9 Detección del micoplasma por inmunofluorescencia directa.

De las muestras congeladas de cada cerdo sacrificado se tomó la parte afectada y se cortó, en cubos de aproximadamente 1 cm³, procurando incluir bronquios y bronquiolos. Como controles negativos se utilizaron un pulmón fetal y un pulmón normal de un cerdo de 6 meses de edad aparentemente sano.

Se realizaron cortes de 8 μ con el crióstato a -20 °C y se colocaron en un portaobjetos de acuerdo al protocolo establecido, posteriormente fueron fijadas en etanol absoluto, durante 10 minutos. Para

esta prueba fue empleado el conjugado elaborado para este trabajo con los procedimientos descritos en el APENDICE 8D.

Método

1. Se colocó el conjugado contra *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 con P.B.S. durante 10 minutos.
4. Se lavaron con agua destilada durante 5 minutos.
5. Se dejaron secar a temperatura ambiente.
6. Se colocó una gota de glicerina a cada muestra y se le colocó un cubreobjetos .
7. Se observó en microscopio de fluorescencia.

4.10. Determinación del título de anticuerpo por Prueba de ELISA Tween 20 .

Para el desarrollo de la prueba fueron utilizados los reactivos y método indirecto sugeridos en el Kit comercial Microwell ELISAmate for Peroxidase Conjugate (KPL Cat. no.54-62-00). Para esta prueba se empleó el antígeno de *Mycoplasma hyopneumoniae* Tween 20 elaborado en este trabajo como se describe en el APENDICE 8 B.

Los pasos que se llevaron a cabo fueron los siguientes:

Aplicación del antígeno de *Mycoplasma hyopenumoniae* Tween 20.

1. Se sensibilizaron placas con 100.µls. del antígeno de *Mycoplasma hyopneumoniae* Tween 20 a una dilución de 1: 30,000 (20 ng/ml) durante toda la noche a 4 °C en solución sensibilizadora.
2. Se retiró el antígeno excedente y se lavó.
3. Se bloqueó la placa con solución de albúmina sérica bovina al 1% aplicando 300 .µls. a cada pozo y se dejó incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Se retiró la solución bloqueadora y se lavó.

Aplicación del suero

Las muestras del suero fueron diluidas previamente 1:100 con P.B.S. y adicionadas a las placas.

1. Después de 1 hr. de incubación a temperatura ambiente fueron lavadas.

Aplicación del anticuerpo secundario.

1. Se adicionaron 100 μ ls. de un conjugado anti IgG porcino de conejo marcado con peroxidasa (Sigma Immunochemicals) a una dilución de 1:2000.
2. Después de 1 hr. de incubación fue lavada la placa.
3. Se adicionaron 300 μ ls de una solución de sustrato consistente en ABTS (2-2azino-di-3 ethalbenzothiazolin sulfone-6) (sal de diamonio) y peróxido de hidrógeno.
4. Después de 15 min. la reacción fue detenida con ácido sulfúrico al 3N.
5. Las placas fueron leídas a una absorbancia de 405 nm.

4.11 Determinación de marcadores de células T.

Para el análisis inmunohistoquímico se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos para este estudio fueron donados amablemente por el Dr. Zuckermann (Universidad de Illinois, EUA), cuyas características se describen a continuación :

<i>Antígeno de superficie celular</i>	<i>Clona</i>	<i>Especificidad</i>	<i>Referencia</i>
CD4	74-12-4	T cooperador	Pescovitz, et al., 1995
CD8	76-2-11	T citotóxico	Pescovitz, et al., 1995

Para la observación de las células se utilizó el kit comercial Extra Avidin Stock No.EXTRA-2 (Inmuochemicals-Sigma), utilizando diamino benzidina (Inmuochemicals-Sigma) como revelador y hematoxilina de Harris como contratinción.

Una vez tomadas las muestras fueron fijadas en una proporción de 1:10 en el fijador PLP (Peryodato-Lisina-Paraformaldehido) (Mac Lean and Kakane, 1974) por un periodo de 24 hrs. y luego se incluyeron en parafina.

Técnica de inmunoperoxidasa indirecta (AVIDINA-BIOTINA).

Las muestras se sometieron al siguiente proceso de tinción sugerido por Ternyck y Avrameas(1989):

1. Delimitación del área de la muestra en la laminilla.
2. Un primer baño de xileno de 15 min.
3. Un segundo baño de xileno de 15 min.
4. Uno de alcohol absoluto por 5 min.
5. Se sumergió en metanol con 2.5 a 3.0% de H₂O₂ por 45 min.
6. Se lavó con PBS por tres veces de 3 a 5 min. cada una.
7. Se bloqueó con suero normal de chivo por 45 min. en cámara húmeda.
8. Se decantó el suero.
9. Sin lavar, se puso el anticuerpo monoclonal primario anti CD4 y anti CD8 a una dilución de 1:50 por un tiempo de 2 hrs. en cámara húmeda.
10. Se realizó una serie de lavados similar a la anterior.
11. Enseguida se colocó el anticuerpo secundario (Ac. biotinilado) por un lapso de 1 hr.
12. Se lavó, a iguales condiciones.
13. Posteriormente se aplicó el tercer anticuerpo (Ac. peroxidado) por 1 hr.
14. Se lavó.
15. Se agregó la solución reveladora (*) y se observó al microscopio óptico por espacio de 10 a 15 min.
16. Una vez que se presentó la reacción, se lavó una vez en PBS.
17. Se contratiñó con hematoxilina de Harris y se hizo virar con agua de la llave (hasta un contraste adecuado con los linfocitos teñidos).
18. Se eliminó el exceso con alcohol ácido.
19. En seguida, se deshidrató la muestra con el objeto de montar y los pasos fueron.
20. Alcohol al 70% por 5 min.
21. Alcohol al 90% por 5 min.
22. Alcohol absoluto por 5 min.
23. Xileno I por 3 min.
24. Xileno II por 3 min.

25. Se montó la muestra con resina sintética marcándose respectivamente para su correcta identificación.

* Se preparó según la siguiente relación : 5 mg. de diaminobencidina por cada 10 ml. de Tris Hcl (pH 7.6), agregando 0.1 ml de H₂O₂ al 3% inmediatamente antes de su uso.

El control negativo fue la ausencia de suero.

Las células positivas fueron contadas determinando el número de células totales en el tejido y por otro lado determinando la densidad de las células (número de células /unidad de área) mediante el uso de un analizador de imágenes VIDS V (SYNOPTICS, Inglaterra) asistido por computadora a 400 X .

Para la determinación por cuentas totales se revisaron de cada preparación 15 planos, contando el número de células en cada plano para posteriormente realizar el promedio y desviación estándar Cabe hacer notar que en esta medición solo se consideró el número de células que aparecen en la pantalla de la computadora.

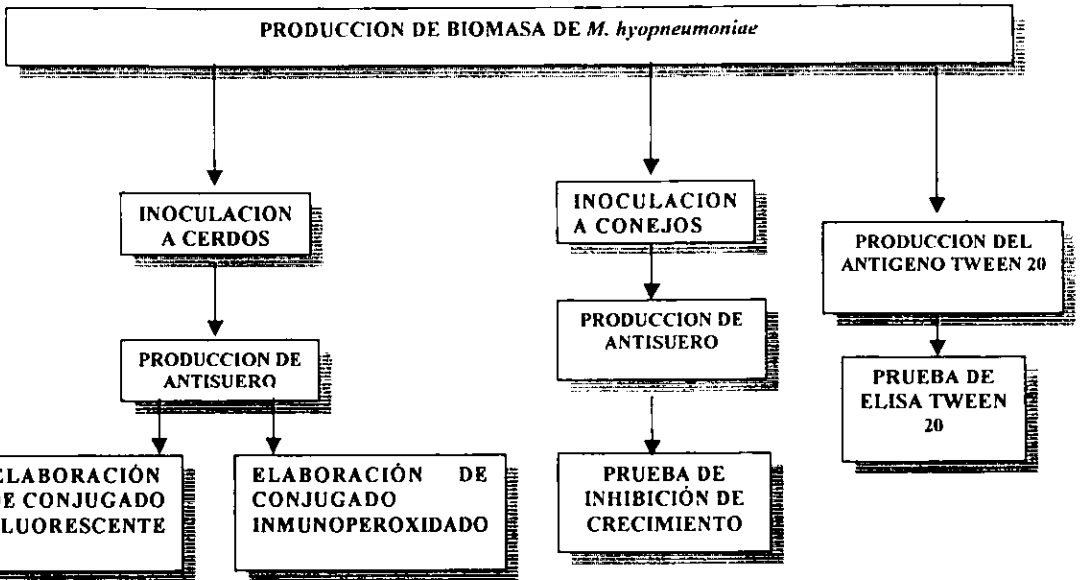
En la determinación de la densidad de células (unidades/ área) se revisaron 15 planos de cada muestra pulmonar tanto para el marcador CD4 como para el de CD8, delimitando el tejido a considerar en el conteo. Los valores obtenidos se multiplicaron por el factor 10⁶ equivalente a la conversión de micras a milímetros, obteniendo así el promedio y desviación estándar de cada preparación. De esta forma se estableció la densidad de células que se encuentran en el área del tejido a contar.

4.12 . Análisis estadístico.

Este se efectuó mediante la prueba de comparación de medias con muestras apareadas para establecer las diferencias entre el grupo de animales testigo e inoculados tanto para las células CD4 como CD8, en las determinaciones de cuentas totales y unidades por área (densidad).

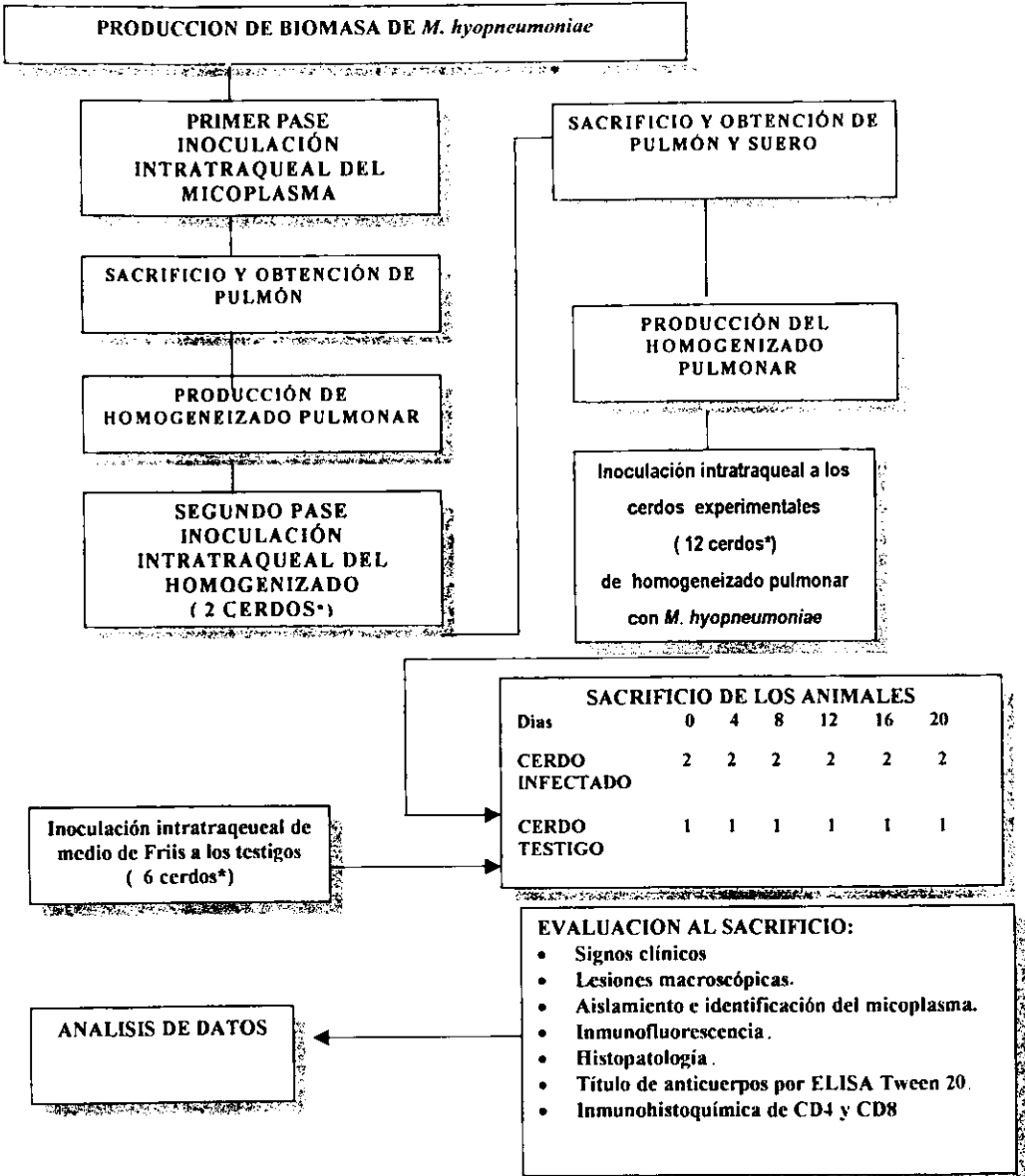
El diseño experimental en general puede ser visto en la figura 4a y b.

Fig. 4 a. Digrama del diseño experimental



Para la realización de este trabajo, fueron realizados estos productos que sirvieron para su empleo en el experimento con los cerdos en el proceso de evaluación, como fueron el de la determinación del título de anticuerpos (ELISA), detección del micoplasma en tejido pulmonar (inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa) y la identificación del micoplasma (prueba de inhibición de crecimiento). Los procesos de elaboración y técnicas pueden ser vistos en la sección de apéndices.

4b. Diagrama del diseño experimental



* Los cerdos empleados en este experimento procedían de una granja libre de enfermedades respiratorias.

5. RESULTADOS.

5.1 Evolución de los signos clínicos en los cerdos de los grupos experimentales.

5.1.1 Temperatura.

Los animales del grupo testigo mostraron temperaturas dentro de los márgenes normales, con un promedio de 38 °C, durante los días posteriores a la inoculación del medio de Friis. De los cerdos inoculados presentaron al día 16 de la infección, uno de ellos una temperatura de 38.5 °C y otro 38.7 y los del día 20, en uno fue de 38.9 °C y en otro de 38.5 °C (Fig. 5).

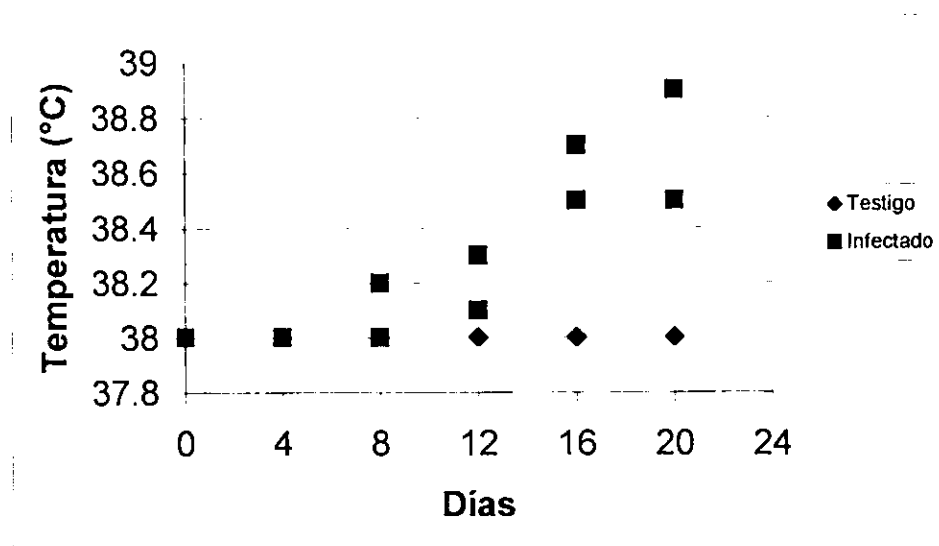


Fig. 5. Temperatura de los animales. Se muestran los valores de cada animal, donde se puede apreciar que los días 16 y 20 fueron en donde los animales infectados con *M. hyopneumoniae* alcanzaron las máximas temperaturas.

5.1.2 Signos respiratorios.

5.1.2.1 Tos.

Después de la inoculación del medio de Friis los cerdos testigo no mostraron signos respiratorios. Los cerdos inoculados con *M. hyopneumoniae* que fueron sacrificados los días 16 y 20 solo mostraron tos leve.

5.1.2.2 Disnea.

La disnea en esfuerzo, fue detectada en los cerdos inoculados entre el día 16 y 20 posinoculación. Los cerdos sacrificados el día 20 presentaron además disnea en reposo así como estertores húmedos.

5.2 Lesiones macroscópicas.

En el grupo I (cerdos sacrificados al día 0) no hubo lesiones pulmonares macroscópicas. Se empezaron a observar lesiones en los pulmones de los animales del grupo II (día 4) y alcanzaron su mayor magnitud al día 16 PI. La distribución de las lesiones macroscópicas de los grupos se resumen en el Cuadro 3. El aspecto de las lesiones en la mayoría de los animales fue de coloración rojiza, así mismo algunos cerdos presentaron inflamación de linfonodos mediastínicos. Los promedios de los porcentajes de lesión en la superficie del área pulmonar consolidada de cada grupo fueron : Grupo I : 0 , Grupo II : 11.4, Grupo III : 9.4, Grupo IV : 8.05 , Grupo V :21.25: Grupo VI : 19.21. En los animales testigo de cada grupo no se encontraron lesiones (Ver Cuadros 3 y 4).

5.3 Lesiones microscópicas.

En los cortes histopatológicos de los animales testigos no se observaron cambios patológicos. Los cortes de las áreas consolidadas en los cerdos inoculados presentaron una serie de cambios los cuales se encuentran descritos en el Cuadro 5 y se pueden apreciar la lesión histopatológica en la figura 11A .

5.4 Detección de *M. hyopneumoniae* en tejido pulmonar por la prueba de Inmunofluorescencia directa.

Se detectó la presencia de *M. hyopneumoniae* por medio de la prueba de inmunofluorescencia en todos los animales inoculados excepto en los cerdos testigo. Esta fluorescencia vario de + a +++ . La fluorescencia fue detectada a partir de los cerdos sacrificados el día 4, así mismo el fenómeno de agrupamiento de los cilios fue detectado a partir del día 8 (Cuadro 6 y Figura 6).

5.5 Microorganismos recuperados.

En todos los cerdos inoculados se logró recuperar a *Mycoplasma hyopneumoniae*, en diluciones que variaron de 10^2 a 10^{-4} como puede apreciarse en el Cuadro 7. De un cerdo del día 16 y otro del día 20 también se logró el aislamiento de *Pasteurella multocida*. En los cerdos testigos el aislamiento bacteriano fue negativo.

5.6 Detección de anticuerpos contra *M. hyopneumoniae* mediante la Prueba de ELISA.

Los títulos de anticuerpos detectados en los animales testigo fueron en promedio de 1:16, considerándose negativos. En los cerdos inoculados se detectaron títulos de anticuerpos de 1:16 el primer día de la inoculación, alcanzado el título máximo de 1:4192 en uno de los cerdos al día 20 del sacrificio como puede apreciarse en el Cuadro 8

5.7 Determinación de células T por cuentas totales.

Las células T con marcador CD4 presentaron una localización preferencial alrededor de bronquios y bronquiolos (Figura 12 A). Se observó un pico de elevación en células CD4+ al día 8 PI (Fig.7), en este mismo día se apreció una activación del tejido linfoide asociado a bronquiolos (BALT), así como salida de las células CD4 a la luz de bronquios y bronquiolos.

El Cuadro 10 muestran los valores de las células CD4+ y CD8+ en el pulmón durante las diferentes etapas de la infección.

Las células CD8+ no se presentaron en un sitio preferencial de localización, su número fue mayor en relación a las CD4+ y se encontraron en todo el tejido y alrededor de los vasos sanguíneos (Figuras 12B). Las células CD8 también mostraron una elevación al día 8 PI (figura 8). El día 12 PI, se manifestó macroscópicamente el inicio de áreas de consolidación y se observó por histopatología que correspondía a la migración de otras células como polimorfonucleares y macrófagos alveolares, fenómeno que se detectó, histológicamente, que iniciaba desde el día 4 PI.

5.8 Determinación de células T en unidades por área

La figura 9 muestra los valores en el pulmón durante las diferentes etapas de la infección de las células CD4 y la figura 10 para las células CD8. Los resultados del número de células CD4+ y CD8+ se pueden observar en el Cuadro 10

5.9 Relación de las células CD4+/CD8+ en el pulmón de los cerdos en diferentes etapas de la infección, determinadas por la prueba de inmunoperoxidasa.

El Cuadro 9 y figura 13 muestran la relación de los porcentajes de células CD4+ con los de las células CD8+ en los pulmones de los animales testigo e infectados con *M. hyopneumoniae*, la cual resulta de la división de los valores de las cuentas totales de CD4 sobre CD8. La figura 13 muestra estos en forma gráfica observándose que existen dos etapas en las que se producen cambios en la relación CD4/CD8, el día 4 donde hay un pico (1.875) y una depresión el día 20 (0.620).

5.10 Análisis estadístico

Por cuentas totales la diferencia entre el grupo de animales testigo y los animales inoculados resultó significativa mediante la prueba de comparación de medias con muestras apareadas para las células CD4+ ($P < 0.05^*$), así como para las unidades por área ($P < 0.05^*$).





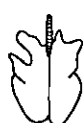













Para el marcador CD8+ se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales y el testigo tanto en cuentas totales ($P < 0.01^{**}$) como en unidades por área ($P < 0.05^*$). El resumen de los resultados del experimento se encuentran condensados en el Cuadro 10.



















CUADRO 3. DISTRIBUCION DE LAS LESIONES MACROSCOPICAS EN LOS PULMONES DE LOS CERDOS

Grupo	GRUPOS EXPERIMENTALES											
	I		II		III		IV		V		VI	
Día del Sacrificio	0		4		8		12		16		20	
	In.	Ctrl.	In.	Ctrl.	In.	Ctrl.	In.	Ctrl.	In.	Ctrl.	In.	Ctrl.
LÓBULOS AFECTADOS												
Craneal Derecho	0	0	0	0	0	0	2/2	0	2/2	0	2/2	0
Craneal Craneal	0	0	1/2	0	1/2	0	0	0	0	0	2/2	0
Medio Craneal caudal	0	0	2/2	0	1/2	0	2/2	0	2/2	0	1/2	0
Craneal caudal	0	0	2/2	0	2/2	0	1/2	0	1/2	0	2/2	0
Caudal Derecho	0	0	2/2	0	1/2	0	0	0	1/2	0	2/2	0
Caudal Izquierdo	0	0	1/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Accesorio	0	0	0	0	0	0	1/2	0	1/2	0	0	0

In. = Cerdo Inoculado Ctrl. = Cerdo Testigo

CUADRO 4 . PORCENTAJE DE LESION ENCONTRADAS EN LOS PULMONES DE LOS CERDOS .

Dia	Grupo	Cerdos Testigos		Cerdo	Cerdos Inoculados		%	Promedio
		D	V		D	V		
0	I			1			0	0
		0	0	2			0	
4	II			3			13.5	11.4
		0	0	4			8.78	
8	III			5			7.4	9.4
		0	0	6			17	

12	IV			7			9.4	8.05
				8			6.7	
16	V			9			2.7	21.25
				10			39.8	
20	VI			11			2.02	19.21
				12			36.4	

D: Vista dorsal V: Vista ventral

Se realizó el aislamiento de *M.hypopneumoniae* y *P. multocida*

CUADRO 5. ESTUDIO DE LAS LESIONES MICROSCOPICAS ENCONTRADAS EN LOS CERDOS INOCULADOS.

Dia	No. de cerdo	Observación
0	1	Zonas de atelectasia y enfisema (no significativas)
	2	Ligero engrosamiento e incremento de mononucleares en septos alveolares.
4	3	Hiperemia y hemorragias. Proliferación del BALT, Macrófagos alveolares. Engrosamiento de septos con mononucleares. Proliferación de epitelio bronquiolar. Zona con consolidación con PMN en alveolos y bronquiolos.
	4	Hiperemia y hemorragias. Activación del BALT Macrófago alveolar. Engrosamiento de septos con mononucleares. Hipertrofia de epitelio bronquiolar. Trombo en arteria pulmonar grande, organizado
8	5	Cambios ligeros consistentes en hiperemia y hemorragias. Macrófagos alveolares. Engrosamiento de septos alveolares con mononucleares. Hipertrofia del epitelio bronquiolar. Atelectasia en bordes. Linfocitos en epitelio bronquiolar.
	6	Hemorragias. Proliferación del BALT. Activación de macrófagos alveolares. Engrosamiento de septos. Atelectasia.
12	7	Hiperemia, hemorragia. Proliferación del BALT. Macrófagos alveolares. Septos alveolares engrosados con mononucleares.
	8	Hiperemia, hemorragia, Proliferación del BALT. Macrófagos alveolares. Septos alveolares engrosados con mononucleares, Hipertrofia del epitelio bronquiolar. Atelectasia.
16	9	Hiperemia y hemorragia, proliferación del BALT. Macrófagos alveolares. Septos alveolares engrosados con mononucleares. Hipertrofia del epitelio bronquiolar. Atelectasia.
	10	Amplias zonas consolidadas. Proliferación del BALT. Macrófagos alveolares. Proliferación del epitelio bronquiolar. Exudado eosinófilo amorfo en alveolos (fibrina), células fusiformes, epitelización alveolar. Neutrófilos (PMN)) en bronquios
20	11	Cambios ligeros consistentes en hiperemia y hemorragias. Macrófagos alveolares. Engrosamiento de septos alveolares con mononucleares. Linfocitos en epitelio bronquiolar. Hipertrofia del epitelio bronquiolar. Atelectasia en bordes.
	12	Hiperemia, hemorragia y exudado fibrinoso. Proliferación del BALT. Macrófagos alveolares. Septos engrosados y alveolos con material hialino amorfo, en algunos focos empiezan a observarse PMN. Proliferación epitelial bronquiolar. Lobulillos consolidados con bronquitis severa con PMN y macrófagos en la luz y material necrótico amorfo (pus). PMN infiltrados en epitelio bronquiolar. Neumonía proliferativa con exudación bronquiolar. Infiltrado de mononucleares en mucosa y submucosa bronquial.

Infección de *Mycoplasma hyopneumoniae* Infección de *M. hyopneumoniae* mas *P. multocida*

Cuadro 6 . Resultados de la prueba de inmunofluorescencia en los cerdos infectados con *M. hyopneumoniae*

Dia	Cerdo Testigo	IFA	Cerdo Infectado	Grado de IFA	Apelmazamiento
0	1	-	1	-	-
			2	-	-
4	2	-	3	++	-
			4	-	-
8	3	-	5	+	+
			6	+	+
12	4	-	7	++	+
			8	++	+
16	5	-	9	+	+
			10	+++	+
20	6	-	11	+	+
			12	++	+

Fig. 6. Prueba de inmunofluorescencia. Observación de focos fluorescentes de cortes de pulmón positivos al aislamiento de *Mycoplasma hyopneumoniae* de animales infectados y sacrificados en diferentes días postinfección.

- A. Día 0, sin focos fluorescentes.**
- B. Día 8, focos fluorescentes pequeños situados en un punto de los bronquios.**
- C. Día 12, focos fluorescentes en toda la mucosa bronquial del tejido afectado.**
- D. Día 20, grandes focos fluorescentes tanto en mucosa como en el exudado que llena parcialmente los bronquios, macrófagos que han ingerido células descamadas e infectadas.**





Cuadro 7. Microorganismos presentes en el pulmón de los cerdos.

Día	Cerdo Testigo	Mh	Pm	Cerdo Inoculado	Mh (UCC)	Pm
0	1	NEG	NEG	1	NEG	NEG
				2	NEG	NEG
4	2	NEG	NEG	3	+10 ²	NEG
				4	+10 ⁴	NEG
8	3	NEG	NEG	5	+10 ³	NEG
				6	+10 ⁴	NEG
12	4	NEG	NEG	7	+10 ³	NEG
				8	+10 ³	NEG
16	5	NEG	NEG	9	+10 ⁴	NEG
				10	+10 ⁴	POS
20	6	NEG	NEG	11	+10 ⁵	NEG
				12	+10 ⁴	POS

Mh : *Mycoplasma hyopneumoniae*Pm : *Pasteurella multocida*

POS : Positivo NEG : Negativo

UCC: Unidades Cambiantes de Color

CUADRO 8 . Resultados de la prueba de ELISA Tween 20 (Enzyme labeled immunosorbent assay) para detectar anticuerpos contra *M. hyopneumoniae* en el suero de los cerdos inoculados y testigos.

Dia	Cerdo Testigo	Titulo	Cerdo Inoculado	Titulo
0	1	1:16	1	1:16
			2	1:16
4	2	1:16	3	1:128
			4	1:128
8	3	1:16	5	1:128
			6	1:128
12	4	1:16	7	1:3144
			8	1:2096
16	5	1:16	9	1:2096
			10	1:572
20	6	1:16	11	1:256
			12	1:4012

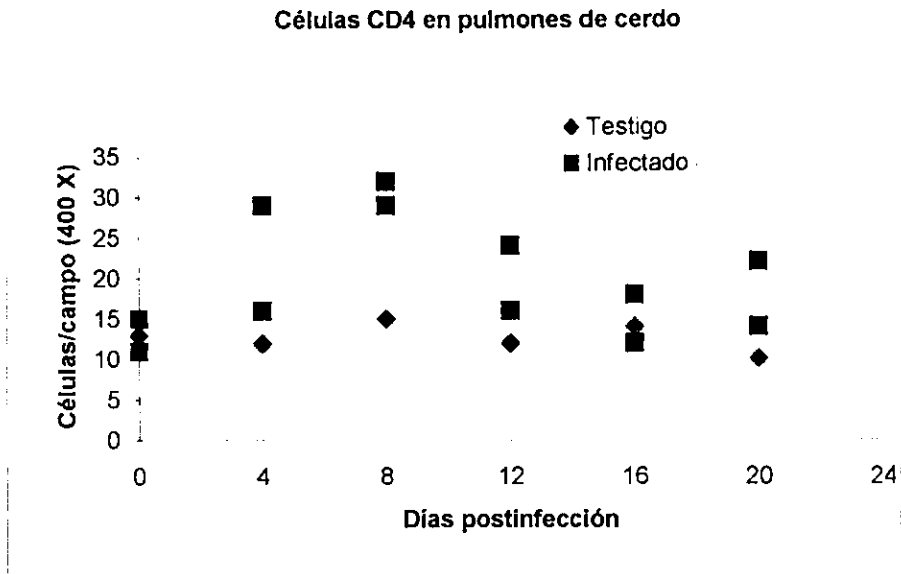


Fig.7. Cinética del efecto de la inoculación de *M. hyopneumoniae* sobre las células CD4+ en tejido pulmonar tanto animales testigo como en inoculados determinados por técnica inmunohistoquímica mediante la prueba de inmunoperoxidasa (Por cuentas totales) (* $P < 0.05$).

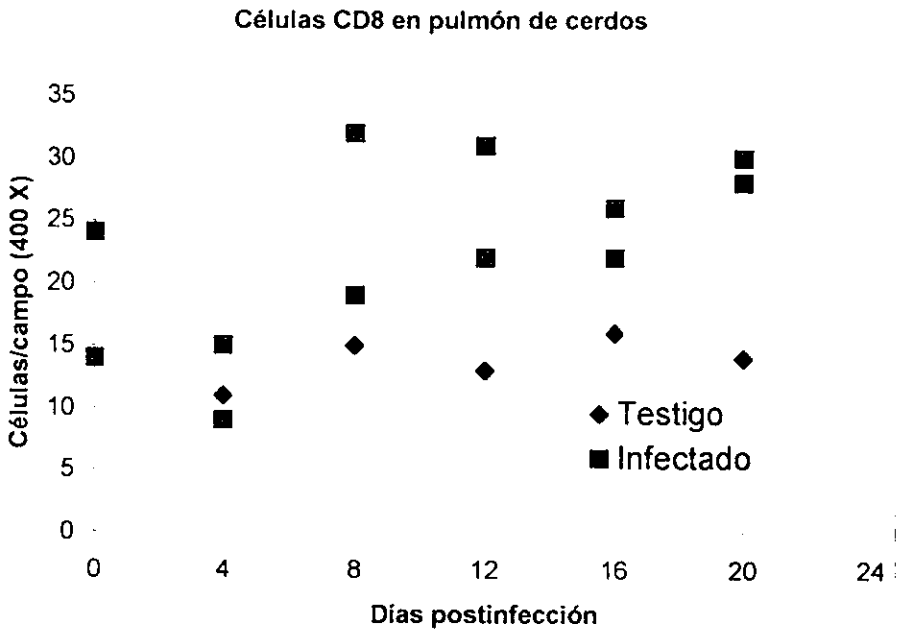


Fig. 8. Cinética del efecto de la inoculación de *M. hyopneumoniae* sobre las células CD8+ en tejido pulmonar tanto animales testigo como en inoculados determinados por técnica inmunohistoquímica mediante la prueba de inmunoperoxidasa (Por cuentas totales) (** $P < 0.001$).

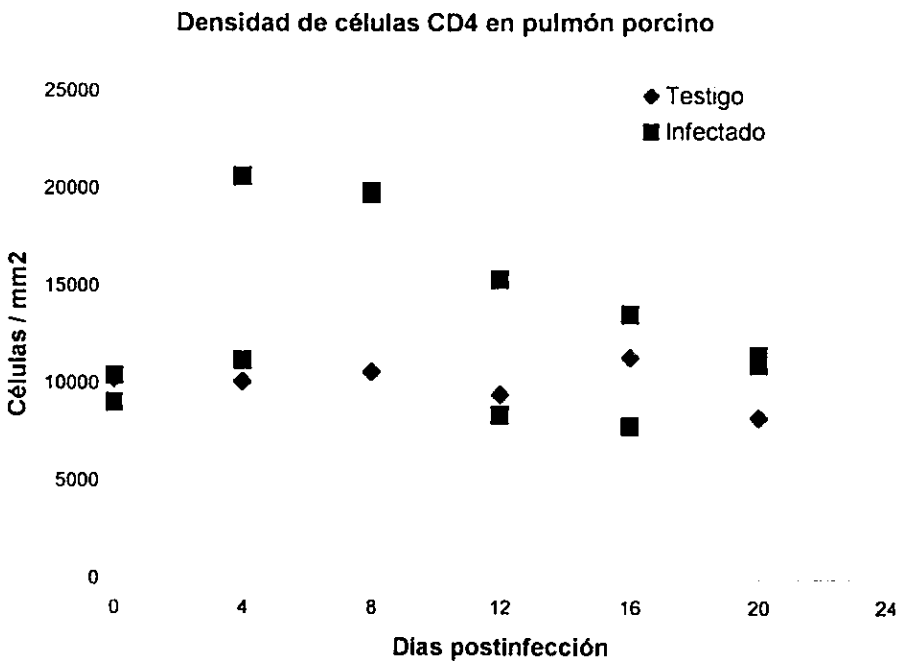


Fig. 9. Cinética del efecto de la inoculación de *M. hyopneumoniae* sobre las células CD4+ en el pulmón tanto en animales testigo e inoculados determinados por técnica inmunohistoquímica mediante la prueba de inmunoperoxidasa (unidades /área)(*P<0.05)

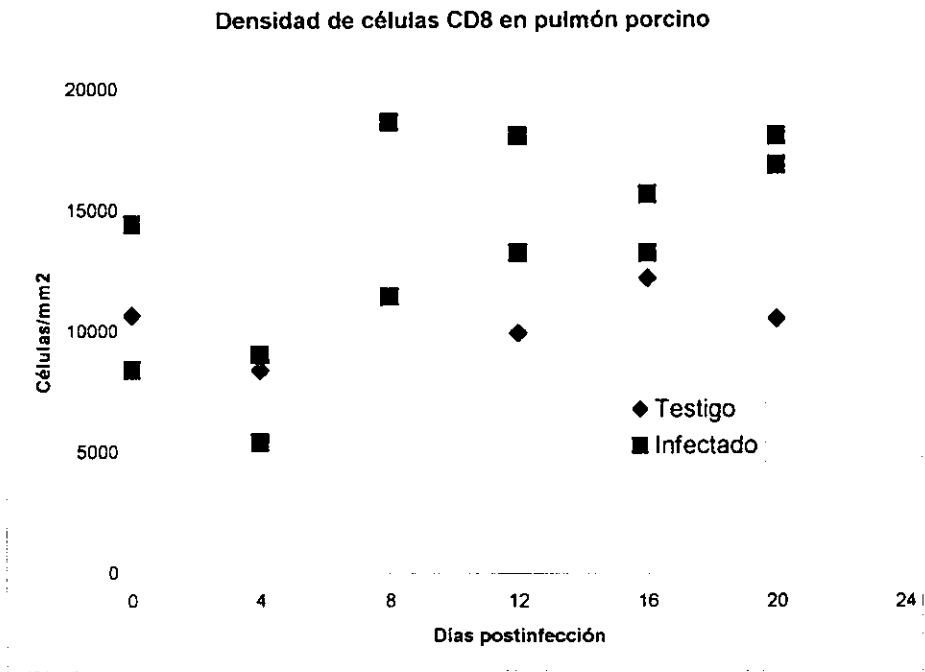


Fig. 10 . Cinética del efecto de la inoculación de *M. hyopneumoniae* sobre las células CD8⁺ en tejido pulmonar en los animales testigo e inoculados determinados por técnica inmunohistoquímica mediante la prueba de inmunoperoxidasa (unidades / área) (*P<0.05)

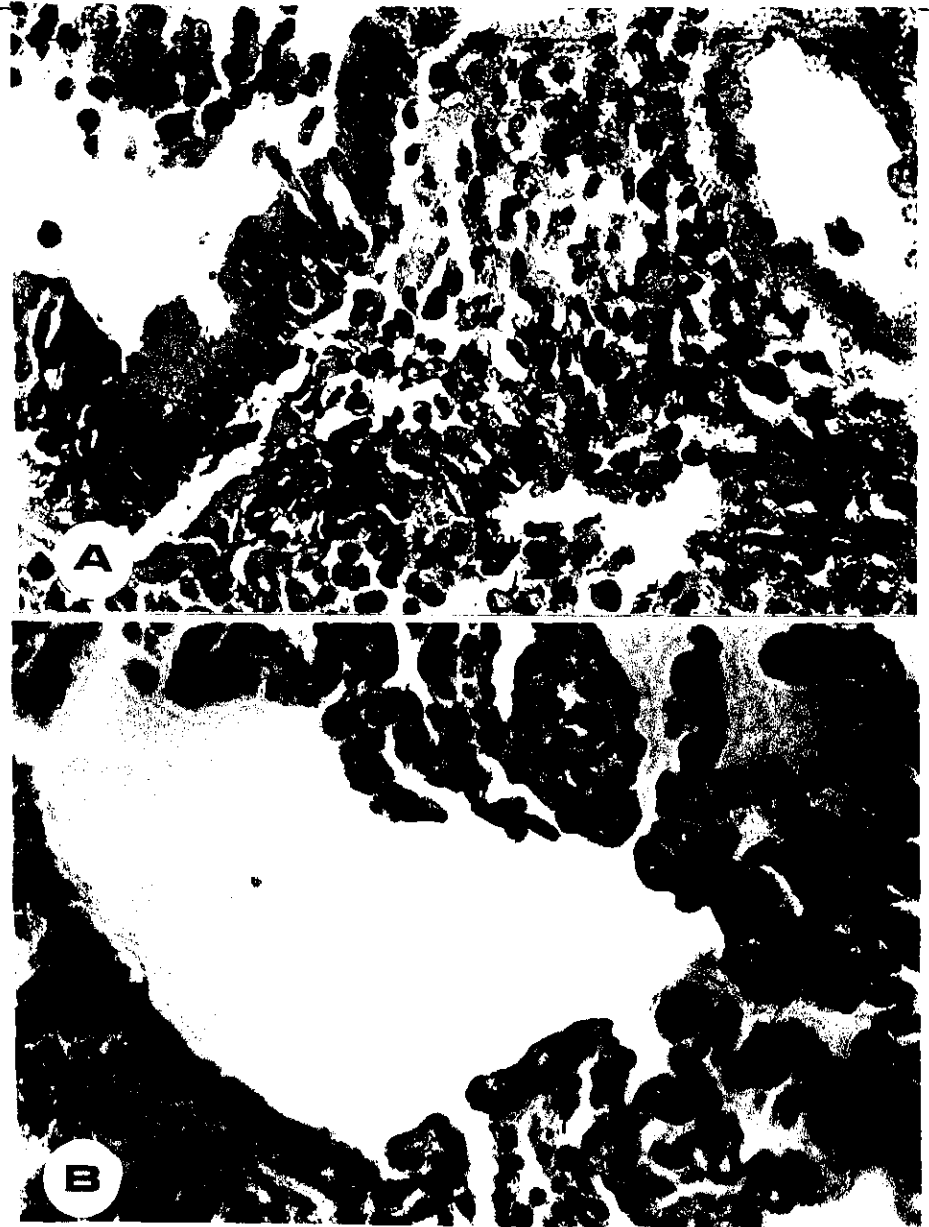


Fig 11.. Sección de pulmón de un cerdo infectado con *M. hyopneumoniae* y sacrificado a los 20 días posinfección. A. Se muestra la proliferación peribronquial linfocítica (Tinción HE 40X). B. Sección de pulmón utilizado como testigo al cual no se le adicionó el anticuerpo monoclonal contra células CD4 (Tinción de HE 40X).

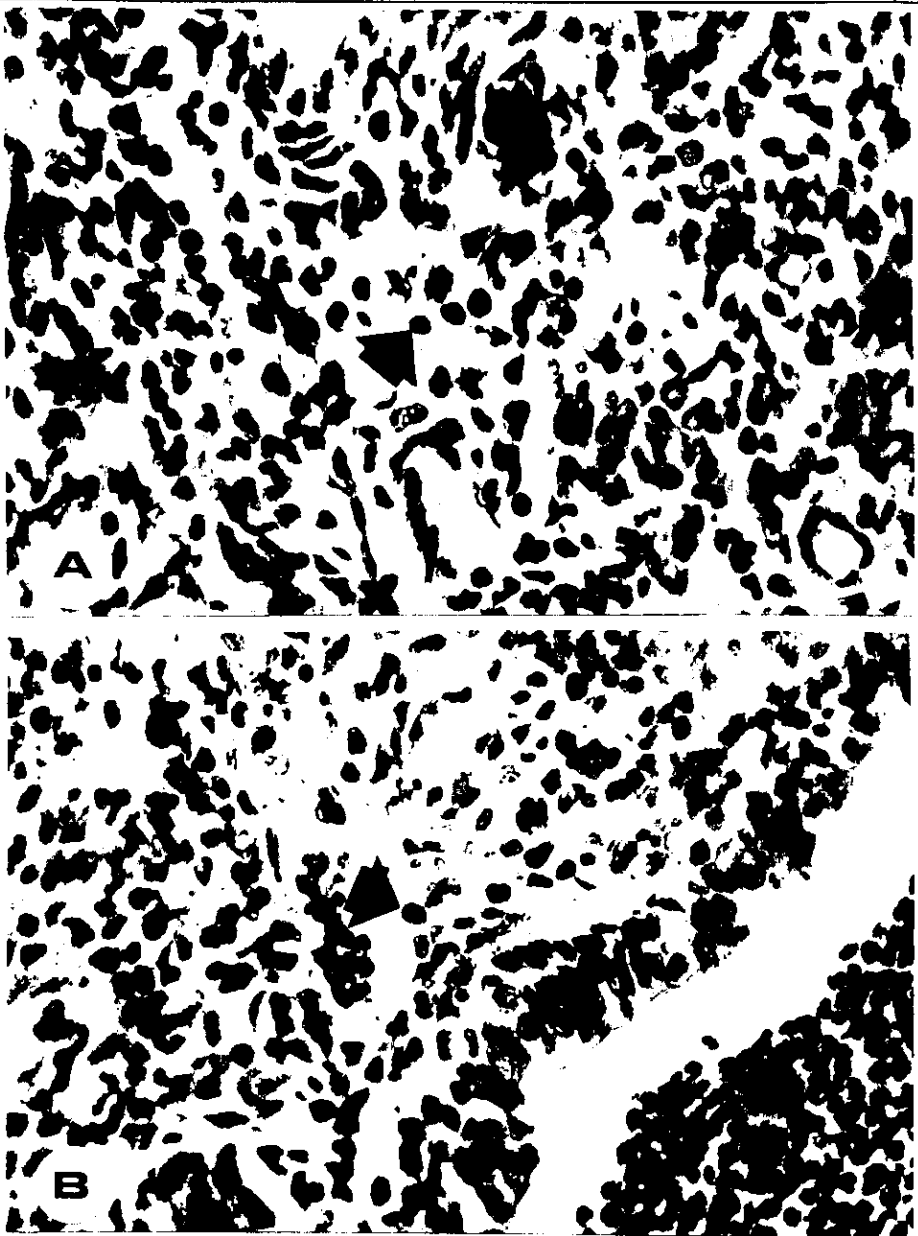


Fig.12. Sección de pulmón de un cerdo infectado con *M. hyopneumoniae* y sacrificado a los 20 días posinfección. A. Se muestran células CD4 teñidas por inmunohistoquímica (flecha) .B. Se muestran células CD8 teñidas por inmunohistoquímica (flecha).

Cuadro 9 . Valores de la relación CD4+/CD8+ en el pulmón de cerdos testigo e infectados con *M. hyopneumoniae*.

DIA	TESTIGO	INFECTADO
0	0.92857	1.04
4	1.09090	1.875
8	1.000	1.1960
12	0.92307	0.7547
16	0.875	0.625
20	0.7142	0.6206

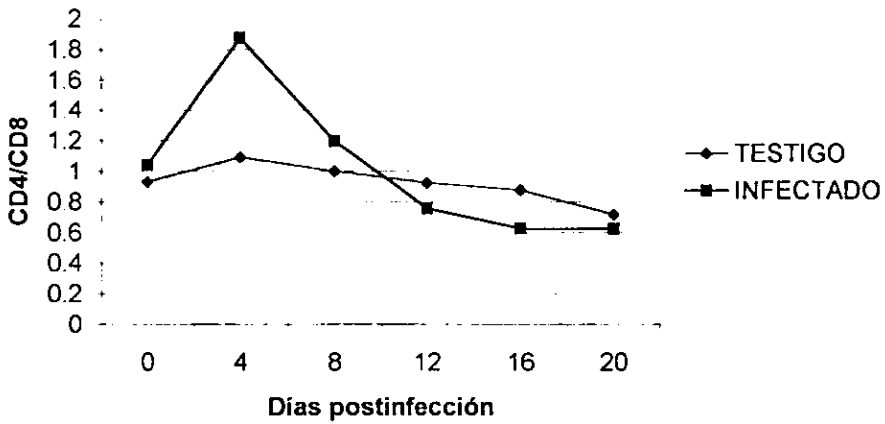


Fig. 13. Cinética de la relación entre células CD4+/CD8+ en el pulmón de cerdos testigo e infectados con *M. hyopneumoniae* en diferentes etapas de la infección.

Cuadro 10 . Resumen de los resultados encontrados en los animales testigo e infectados con *Mycoplasma hyopneumoniae*.

DIA	% LESION PULMONAR		ELISA TWEEN 20 (log)		<i>M.hyop.</i>		<i>P.m.</i>
	Testigo	Infectado	Testigo	Infectado	Testigo	Infectado	
0	0	0	1:16	1:16	-	-	-
		0		1:16			
4	0	13.5	1:16	1:128	-	+ *10 ²	-
		8.78		1:128		+10 ⁴	-
8	0	7.4	1:16	1:128	-	+10 ³	-
		11.4		1:128		+10 ⁴	-
12	0	9.4	1:16	1:1314	-	+10 ³	-
		6.7		1:2096		+10 ³	-
16	0	2.7	1:16	1:2096	-	+10 ⁴	-
		39.8		1:572		+10 ⁴	-
20	0	2.02	1:16	1:256	-	+10 ⁵	-
		36.4		1:4012		+10 ⁴	-

DIAS	IFA		CD4** CEL/mm ²		CD8** CEL/mm ²	
	Testigo	Infectado	Testigo	Infectado	Testigo	Infectado
0	-	-	10245	10400	10695	8439
		-		9042		14467
4	-	++	10123	11200	8403	5425
		+		20700		9042
8	-	+ A	10629	19892	11459	11453
		+ A		19800		18686
12	-	++ A	9460	8400	9931	13261
		++ A		15400		18083
16	-	+ A	11349	13600	12223	15672
		+++A		7836		13261
20	-	+	8285	11000	10542	16878
		++ A		11453		18083

A: Apelmazamiento de los cilios * Unidades por área ** Dilución del cultivo con crecimiento correspondiente a las Unidades Cambiantes de color (UCC). IFA : Inmunofluorescencia (de + a +++).

M. hyop : *Mycoplasma hyopneumoniae*, *P.m.* : *Pasteurella multocida*

6. DISCUSION.

La respuesta inmune local, de los linfonodos y del tejido asociado a bronquios, es un aspecto aún poco estudiado en el cerdo (Tacker *et al.*, 1998). Por otro lado, el hecho de que la supresión de la respuesta de células T, reduce la severidad de las lesiones neumónicas causadas por *M. hyopneumoniae*, sugiere que la inmunidad celular ayuda al desarrollo de las lesiones de la neumonía micoplásmica (Tajima, 1984).

Para la reproducción de la enfermedad en el presente trabajo se consideró que la metodología planteada por Ross (1984) y Hannan (1984) era la más adecuada. Esto se realizó con base en que se ha visto que *M. hyopneumoniae* incrementa su virulencia cuando es cultivado en medio adicionado con homogeneizado pulmonar irradiado o con homogeneizado de un cerdo infectado con el micoplasma. lo que sugiere la presencia de un componente pulmonar que le permita expresar su virulencia (Hsu, 1997), es por ello que se requirió de cerdos negativos a la neumonía enzoótica.

La búsqueda de animales negativos a la enfermedad fue uno de los problemas, dado que en nuestro país no existen granjas con animales gnotobioticos, para enfermedades respiratorias, como es en Europa y Estados Unidos. En estados del país como Sonora y Puebla, existían granjas donde llevan programas de *todo dentro, todo fuera*, así como el sistema de producción de tres sitios. Sin embargo el costo de los lechones y el transporte de los mismos a Cuautitlán que es una zona sucia de Fiebre Porcina Clásica y Aujeszki hacían difícil su uso. Una granja en el municipio de Zumpango con control de enfermedades respiratorias y donde no se vacunaba contra *M. hyopneumoniae*, permitió usar estos lechones convencionales, de madres de 5 o más partos, una vez que se determinó que eran negativos con la Prueba de ELISA Tween 20.

El hecho de carecer de cerdos gnotobióticos o SPF, no ha sido impedimento para la realización de investigación concerniente a las distintas enfermedades en México, lo cual ha permitido la publicación de datos a nivel internacional desde hace algunos años por varios autores (Ciprián *et al.*, 1988, Hernández, *et al.*, 1998, Pijoan and Ochoa, 1978) siempre tratando de establecer los controles de salud necesarios para el uso de animales convencionales, como fueron realizados para este estudio.

En el primer pase en cerdos utilizando un cultivo de *M. hyopneumoniae* con título de 10^9 UCC, se observó un desarrollo de lesión pulmonar del 1%, con detección positiva del micoplasma por medio

de inmunofluorescencia y ya en el segundo pase empleando homogeneizado pulmonar del primer animal se incrementó la lesión pulmonar a 5% en los dos cerdos utilizados, siendo estos positivos a la prueba de inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa y ELISA Tween 20 donde alcanzaron el título uno de los cerdos de 1:1048 y el otro de 1:524, siendo ambos positivos

Después de realizada la inoculación de *M. hyopneumoniae*, tanto la temperatura corporal como los signos respiratorios de los cerdos del grupo testigo fueron normales. En los cerdos inoculados con *M. hyopneumoniae* provocó hipotermia en uno de los cerdos del día 16 y en uno del día 20. Uno de los cerdos mostró hipertermia mayor debido a que en este animal también se aisló *P. multocida*, este dato concuerda con Smith (1973) y Ciprián *et al.*, (1988) donde en cerdos convencionales o gnotobióticos se inoculan simultáneamente *M. hyopneumoniae* y *P. multocida*. Los cerdos inoculados con *M. hyopneumoniae* presentaron dificultad respiratoria ligera con estertores hacia el final del experimento, como ocurre en las infecciones experimentales tal como lo comunica Whittlestone (1979). El grupo de animales infectados en el cual se reprodujo la neumonía enzoótica, presentó el mayor grado de lesión neumónica, que consistió en lesiones de etapas intermedias de la enfermedad. *Mycoplasma hyopneumoniae* se aisló e identificó en todos los pulmones lo que indicó que todos los cerdos estaban infectados. Existieron dos cerdos que presentaron las lesiones más severas, los días 16 y 20 (cerdos 10 y 12), uno de cada día, en donde 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) y Amass *et al.*, (1994). Sin embargo, existe un cerdo del cuarto día (cerdo 3), que por el cuadro de lesiones histopatológicas con presencia de pólimorfonucleares, sugieren que también estuvo infectado con *Pasteurella multocida*, pero que quizá no se aisló por la baja concentración del microorganismo o situaciones de la respuesta inmune en este periodo.

Las lesiones pulmonares macroscópicas se comenzaron a apreciar a partir del día 4 P.I., con un 11.4 % de lesión y al día 20 P.I. se observó un promedio de 19.21%.

Al determinar el desarrollo de las lesiones Feenstra *et al.*, (1994) inocularon cerdos sólo con *Mycoplasma hyopneumoniae* determinando el grado de los signos respiratorios, lesiones pulmonares y el aislamiento del micoplasma y *P. multocida*. Encontraron que a los 14 días postinfección una parte del pulmón de todos los animales presentaba consolidación, la que aumentó a los 28 días y posteriormente se redujo paulatinamente. En este caso el micoplasma tubo un efecto

potencializador, dado que la infección mixta estuvo asociada con un mayor grado de lesión pulmonar, tal como sucedió con uno de los animales del día 16 y otro del día 20.

En cuanto a las lesiones macroscópicas, dependen del tipo de infección, Cuando esta se llevó a cabo en forma experimental en cerdos privados de calostro, con cultivos puros de *M. hyopneumoniae*, con una cepa de bajo pasaje, se observó el área ligeramente inflamada, brillante, de distribución lobular y de color púrpura (Armstrong,1982). En cerdos gnotobióticos, SPF y obtenidos de granjas libres de neumonia enzoótica, las lesiones encontradas fueron áreas de consolidación de color gris-pálido, gris-rojizas o rojas (Hodges *et al.*, 1969, Etheridge *et al.*, 1979 y Pfifer y Ross, 1984). Al principio de la enfermedad, los lóbulos estaban ligeramente inflamados y brillantes y tenían una consistencia carnosa al corte y las vías respiratorias contenían un exudado blanco, pegajoso y mucoso, siendo en esta fase de la infección los tiempos ideales para el aislamiento de *M. hyopneumoniae*, debido a que se encuentra en grandes cantidades. Posteriormente, las lesiones se redujeron y se comprimieron por debajo de la superficie del tejido pulmonar normal y la consistencia fue más fibrosa, además de estar exentas de exudado (Armstrong,1982).

En los cerdos que se sacrificaron al primer día se observó la arquitectura histológica normal del pulmón, hasta la presencia de una infiltración linfocitaria característica de esta enfermedad, lo cual no se observó en los pulmones de los cerdos testigos.

No se sabe si la acumulación masiva de células inmunológicamente activas en las neumonías por micoplasmas es perjudicial o benéfica para la resolución de la enfermedad (Ross, 1984), ya que en estudios microscópicos de las lesiones se encontró hiperplasia linforreticular perivascular, peribronquial y peribronquiolar en cerdos infectados experimentalmente con *M. hyopneumoniae* (Livingstone *et al.*, 1972 y Whittlestone, 1973).

Desde el punto de vista histopatológico se reportan una serie de cambios pulmonares en etapas tempranas, de 7 a 28 días postinoculación, en la luz de los bronquios, bronquiolos y alveólos, se encontraron macrófagos y pérdida de cilios. En la etapa de la infección establecida, de 17 a 40 días, hay una extensa proliferación de tejido linforreticular en áreas peribronquiales y perivasculares, en la

lámina propia se encontró penetración de linfocitos, una disminución de polimorfonucleares y edema (Ross, 1984), como pudo observarse en este trabajo.

La histopatología mostró el desarrollo de lesiones características, observándose al día 20 P.I., la infiltración peribronquial y perivascular típica de la enfermedad como la reportada por Stevenson (1998).

Los animales inoculados resultaron positivos a la prueba de ELISA Tween 20 a partir del día 12, en cambio los controles permanecieron negativos. Este hecho concuerda con lo reportado por Bruggman y Keller (1977) y Kazama *et al.*, (1988) que detectan anticuerpos a partir de la segunda semana, con fluctuaciones en los títulos de los animales infectados intranasalmente, hasta por 20 semanas postinfección.

Sorensen *et al.*, (1994) inocularon cerdos con *Mycoplasma hyopneumoniae* y asociaron los signos clínicos, las lesiones pulmonares y la respuesta de anticuerpos en el suero por ELISA, determinando que el 10% de los animales tuvieron títulos a los 15 días, lo cual coincide con lo observado en este trabajo.

En los cerdos control no se detectó fluorescencia específica, en cambio en los cerdos inoculados todos mostraron fluorescencia lo cual confirmó que los animales estaban infectados. La fluorescencia fue variable y a partir del día 8 el fenómeno de agrupamiento en el que los cilios se unen formando mechones, se atribuye a que la superficie pegajosa del micoplasma determina que los cilios se peguen entre sí (Hsu, 1998).

En algunas ocasiones se ha dudado de la especificidad de la prueba de inmunofluorescencia y para determinar la sensibilidad de los métodos de diagnóstico, Sorensen *et al.*, (1994) inocularon 196 cerdos SPF con *Mycoplasma hyopneumoniae* y los sacrificaron a diferentes tiempos; el diagnóstico lo hicieron utilizando lóbulos cardíacos y apicales, con o sin lesiones neumónicas. Al determinar la sensibilidad de cuatro pruebas, aislamiento, inmunofluorescencia, PCR y ELISA durante la fase aguda de la infección entre los 14 y 28 días posinfección, se encontró que el cultivo era el más sensible en comparación con la inmunofluorescencia, la reacción en cadena de la polimerasa o un ensayo inmunoenzimático para detectar el antígeno. De este estudio se determinó que la

inmunofluorescencia era equiparable al PCR y que el aislamiento era el mejor método de diagnóstico sobre todo para los casos crónicos.

Con relación al comportamiento de las células T con marcador CD4+ se observó que tenía una localización preferencial alrededor de bronquios y bronquiolos. Se observaron dos picos de elevación de éstas células al día 4 y 12 P.I. Es de hacer notar que a partir del día 8 P.I. se apreció una activación del tejido linfoide asociado a bronquios (BALT), coincidiendo esto con la elevación de anticuerpos observada en la prueba de ELISA. Bernd y Muller (1995) estudiaron la distribución de las subpoblaciones de las células T en el pulmón, linfonodos linfáticos pulmonares y tonsilas en una infección intratraqueal por *Pasteurella multocida* tipo A, en cerdos SPF, empleando técnicas de inmunohistoquímica con un panel de anticuerpos monoclonales contra los antígenos de linfocitos porcinos, para detectar los antígenos de MHC Clase II : SWC1, SWC3a, CD2a, CD4a, CD8b. En las primeras horas de la infección, el estudio reveló una acumulación de células CD4+ y CD8+ así como de células con antígeno SWC1. En el curso de la infección desaparecen las células SWC1+ y SWC3 y existe una concentración de células CD2a+, CD4a+ y CD8 en las zonas perivascular y peribronquial a las 72 hr. postinfección, lo cual coincide con el presente trabajo en cuanto a la localización y preferencia de las células CD4 y con las células CD8, las cuales aparecen después y tienen una distribución en todo el parénquima pulmonar.

Mossman *et al.*, (1986) demostraron que existen clones de las células CD4+, con base a su producción de citocinas. Estas se denominan Th1 (T cooperadoras 1) y Th2 (T cooperadoras 2), siendo las Th1 las encargadas de producir interleucina 2 (IL-2), interferón γ (IFN γ) y el Factor de Necrosis Tumoral Beta (TNF- β) y las clones Th2 aquellas que producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y IL-13. Un aspecto importante del conocimiento de estas clones es el hecho que gran parte de los procesos patológicos incluyendo infecciones, desórdenes atópicos y autoinmunes, han sido relacionados con la expresión de citocinas (Th1 o Th2) y por lo tanto a la inducción de una subpoblación en particular. En el caso de enfermedades infecciosas, el balance entre las respuestas Th1 y Th2 contra un agente infeccioso puede influenciar el crecimiento del patógeno y la inmunopatología.

Las respuestas antimicrobianas Th1 pueden producir reacciones como inflamación granulomatosa, artritis y colitis (Romagnani, 1994). Los daños tisulares al huésped ocurren debido a los efectos

tóxicos de las interleucinas y otros mediadores de la inflamación liberados durante el ataque inmune al patógeno. También pueden ocurrir reacciones patológicas severas como resultado de la interregulación defectuosa de IL-10, el TNF- β y otras citocinas que normalmente inhiben funciones efectoras de Th1. La similitud de estas patologías con enfermedades autoinmunes, apoya la noción de un mecanismo común de daño de tejido debido a la excesiva o descontrolada respuesta de Th1. Estos datos expuestos anteriormente no han sido dilucidados en relación a *M. hyopneumoniae* u otros patógenos en el cerdo, sin embargo se ha comenzado a estudiar las subpoblaciones Th1 y Th2 de CD4 +, tratando de esclarecer la participación de las interleucinas (Tacker, 1998)

Las citocinas pueden contribuir de manera directa al daño de los tejidos y el patrón de citocina que producen las células Th1 también influye en el desarrollo de la enfermedad. Por tanto, si predomina una respuesta celular Th1, las citocinas IL-2 e IFN- γ que se producen, tenderán a fomentar los efectos citotóxicos y a los macrófagos activados. Por el contrario, si se desencadena una respuesta Th2, habrá tendencia a la síntesis de anticuerpos y al desarrollo de una alergia (Carding, 1992, Tizard, 1998)

Muchos de los micoplasmas patógenos poseen actividades inmunomoduladoras incluyendo la inducción de citocinas, con excepción del superantígeno secretado por *Mycoplasma arthritidis* (Cole y Atkin, 1991) , las propiedades inmunomoduladoras no han sido bien caracterizadas o bien no han mostrado ser relevantes en la patogenicidad. Por ejemplo en *Mycoplasma mycoides ssp mycoides* que es el principal patógeno de cabras y ovinos en donde causa septicemia, conjuntivitis, mastitis y neumonía, se han comparado los signos clínicos y los cambios observados a la necropsia como similares a una respuesta por un lipopolisacárido bacteriano (Endotoxina LPS). Se sabe que los procesos patológicos implicados estimulan la producción de citocinas como el TNF α , IL-1 e IL-6 y óxido nítrico, liberados para estimular a macrófagos (Ponnia, *et al.*, 1998, Rosendal *et al.*, 1995).

Con respecto a las células CD8, estas no se acumularon en un sitio preferencial durante la patogénesis de la neumonía enzoótica, siendo siempre mayor el número de ellas circulando en todo el tejido. Las células CD8 también mostraron una elevación significativa el día 8. El día 12 PI, se singularizó por el inicio de áreas de consolidación, que por histopatología correspondieron a la llegada de otras células como fueron polimorfonucleares, asociados a la presencia de *Pasteurella*

multocida y macrófagos. El día 20 PI se marca un elevado número de células CD8 que coincide con el día en que se observó una mayor lesión pulmonar, lo que probablemente implicaría su actividad citotóxica no solo hacia el micoplasma sino también el tejido pulmonar.

En este trabajo se notaron células que morfológicamente no correspondían a linfocitos y que sin embargo producían una reacción positiva a la prueba de inmunoperoxidasa para células CD8. Recientemente se ha detectado que la presencia de las moléculas características de las células CD8, están ampliamente distribuidas en las células porcinas T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$. Otras células que tienen expresado en pequeña proporción el marcador CD8 son CD4+8-, CD4+ 8 low, CD2-4-8-, CD2+4-8-, CD2+4- low, además de las células asesinas naturales NK las cuales han sido caracterizadas con el fenotipo Ig-CD2+3-4-8 low (Zuckerman *et al.*, 1998).

En este trabajo se realizaron dos tipos de mediciones para las células T, por cuentas totales y por densidad (unidades por área), siendo en ambos casos significativo para células CD4+ y CD8+, encontrándose ser doblemente significativo en cuentas totales (** $p > 0.001$). Recordando que, la medición de cuentas totales solo establece el número de células positivas a la reacción inmunohistoquímica, que aparecen en la pantalla del monitor de la computadora y la otra, realiza la determinación considerando a estas células dentro de un determinado volumen de tejido, es por lo tanto, la densidad, el parámetro más válido para ser considerado como de referencia, pero como se vio en este trabajo ambas mediciones fueron estadísticamente significativas.

De acuerdo al comportamiento de estas células y el aislamiento de *Pasteurella multocida*, se puede dividir este trabajo en dos etapas, una primera etapa del día 0 al 12, en donde sólo se aisló al micoplasma, y del día 16 al 20, al micoplasma con la pasteurela, es decir en esta última etapa estamos ante una interacción.

Tanto para las células CD4 y CD8, en los primeros 8 días, se marcan con los mayores títulos y el descenso más bajo al día 16. Posteriormente existe un repunte en las cuentas para ambas células al día 20.

Haciendo una descripción del ambiente microbiano y celular al momento de la infección por el micoplasma, en función de los resultados de este trabajo, el micoplasma inoculado al pulmón al

área traqueobronquial, se relacionó con la superficie de la mucosa y los cilios que intentan empujarlo y arrojarlo al exterior. Pero el conjunto de micoplasmas conglojera los cilios y forma "madejas" con lo que impide que sea removido al exterior (Tacker,1998). Los micoplasmas bajan a la base de los cilios, donde comienzan a destruirlos a través de enzimas y establecen su permanencia en el tejido pulmonar. Sin embargo, no atraviesan el tejido debido a la presencia de células de defensa tales como macrófagos y células T.

El panorama histológico del pulmón esta compuesto por mononucleares, moco y cilios en constante movimiento. Internamente, alrededor de bronquios y bronquiolos están las células T, las células CD4+ (cooperadoras) en forma casi fija y las células CD8+ (citotóxicas) circulando constantemente en los septos alveolares.

El día 4, se refleja con la primera activación de células CD4, lo cual junto con células plasmáticas origina que el título de anticuerpos comience a elevarse (de 1: 64 a 1:128). El micoplasma se establece en un segmento del bronquio lo cual se detecta por inmunofluorescencia, como un punto fluorescente originando una descamación del epitelio lo que activa a los macrófagos alveolares, la reacción inflamatoria y la posible liberación de citocinas, lo que puede explicar la destrucción del epitelio y causar hemorragias. Esto trae consigo la atracción de mayor número de células al lugar, provocando un engrosamiento de los septos con la aparición de células mononucleares; así mismo comienza a manifestarse la hipertrofia del epitelio bronquiolar, en respuesta a la descamación.

En el día 8 se observan los mismos cambios observados anteriormente. El micoplasma continua invadiendo el bronquio y ya va originando el agrupamiento o apelmazamiento de los cilios. Es probable que a través de la liberación de proteínas citolíticas comience a destruir los cilios. La fluorescencia se observa mejor, lo que significa que el número de micoplasmas va en aumento. En trabajos previos (Sorensen,1994, Armstrong,1994) siempre se ha utilizado la prueba de inmunofluorescencia como parte de los trabajos experimentales. En este trabajo por la forma secuencial en que fueron sacrificándose los animales, se pudo percibir como el micoplasma al inicio se localiza en punto del bronquio, para posteriormente ir avanzando sobre la mucosa y hasta el día 20 invadirla completamente con la formación de un anillo fluorescente, de este fenómeno no se encontró en la bibliografía alguna descripción similar.

Es de llamar la atención que a partir de este día comience a ocurrir la proliferación del BALT (tejido linfóide asociado a bronquios), en donde existe una gran cantidad de linfocitos B y T, lo cual es significativo para la subsiguiente producción de anticuerpos del tipo IgG que será reconocido en el suero de los animales infectados, a pesar de que en este día los títulos aún se mantengan bajos (1:128). La lesión pulmonar disminuye ligeramente, también existe un descenso notorio tanto de las células CD4 y CD8, probablemente debido a que estas estén siendo superadas por otras células que están llegando o por que estas estén migrando no solo al BALT sino a linfonodos regionales cercanos.

Ya en el día 12, la fluorescencia detectada es una de las mejor manifestadas, así como el apelmazamiento de los cilios. La hipertrofia del epitelio bronquiolar está más acentuada, lo que da pie a la pérdida del tejido pulmonar que comienza a consolidarse. Las células CD8 también sufren un incremento pero no es significativo. En estas circunstancias el pulmón se encuentra "desprotegido" y puede llegar otro invasor, lo que ocurrió en este experimento ya que en los subsiguientes días se observó la aparición de un patógeno secundario común, que es *Pasteurella multocida*, lo cual ejemplifica lo que pasa en condiciones de campo (Ciprián *et al.*, 1988, Amass, 1994).

En el día 16, destacan dos tipos de animales, los que sufren una micoplasmosis pura y otros que tienen una infección secundaria por *Pasteurella multocida*. Tanto en el día 16 como en el día 20 un animal sufrió la infección de *Pasteurella multocida*, lo que originó un cambio drástico en los promedios de las mediciones.

El día 16, el cerdo al que se le aisló *Pasteurella multocida* (cerdo 10) incrementa la fluorescencia, ya que alcanza la máxima expresión de todos los animales del experimento (++++). La lesión pulmonar llega a su mayor expresión (21.25%), los anticuerpos tienen una ligera disminución (1:1334) y las células CD4 y CD8 van en descenso. Las zonas de consolidación se hacen más amplias, aparece exudado con la presencia de neutrófilos, hay una gran activación de macrófagos alveolares y la activación del BALT. Los parámetros del cerdo 9 del que sólo se aisló al micoplasma, fueron distintos, con un 2.7 % de lesión pulmonar, una fluorescencia baja (+), su histopatología

muestra cambios ligeros (hiperemia, hemorragia, atelectasia), sus células CD4 y CD8 tienen una tendencia hacia la baja.

Ya en el último día del experimento, el día 20, en el cerdo del que se aisló *Pasteurella multocida* (cerdo 12), se encuentra una bronquitis severa con la aparición de polimorfonucleares y macrófagos en la luz, así como exudado y se manifiesta una neumonía proliferativa, al igual que como consolidación del tejido pulmonar. La cantidad de micoplasmas es la más alta y la prueba de inmunofluorescencia la hace evidente ya que se observa la formación de un anillo completamente fluorescente. El título de anticuerpos se mantiene alto (1:1224). La superficie de lesión pulmonar se mantiene alta con un promedio de 19.21 %. Las células CD4 tienen una elevación, pero esta es más notoria para células CD8, la cual es la segunda cuenta más alta de todo el experimento (42409). El animal número 11 con una micoplasmosis pura presentó un porcentaje de lesión pulmonar bajo de 2.07%, histológicamente sólo existen cambios ligeros, la fluorescencia es baja así como el número de micoplasmas.

Si sólo hubiera el establecimiento del micoplasma se notaría que existe un pico para las células CD4, en el día 4 y para CD8 al día 8 (ver figuras 7,8,10), con una tendencia a la baja en los días 16 y 20. Pero al aparecer *Pasteurella multocida*, en el día 16 ocurre un incremento de CD4 y CD8 al día 20 y se agrava el cuadro de lesión, producto de la asociación etiológica.

La gran llegada de células a tejido donde se considera que no se establece *M. hyopneumoniae* y la actividad mitogénica que ha demostrado tener, hace pensar que este se comporte como un superantígeno, hecho que se ha observado en otros micoplasmas (Tryon, 1992).

Los mecanismos involucrados en el desarrollo de la respuesta linfocítica peribronquial no están bien aclarados. La respuesta de infiltración puede ser debida a la persistencia de los micoplasmas en la superficie del conducto respiratorio ya que estos no atraviesan la mucosa (Simecka *et al.*, 1992).

En este trabajo, se trató de ver un aspecto desconocido, la reacción celular de las células CD4 y CD8 en el tejido pulmonar y además se trató de correlacionar el comportamiento de estas células con otros eventos tales como la producción de anticuerpos y el desarrollo de lesiones pulmonares. Sin embargo, hay que hacer la aclaración que también en este experimento hay la infección pura del micoplasma, ocurrida en casi todos los animales y la interacción del micoplasma con la *P. multocida* ocurrida en los cerdos 10 y 12.

Es difícil correlacionar parámetros distintos, lo cual le ha ocurrido a otros investigadores, que sólo establecen algunas relaciones. Tal es el caso de Tacker *et al.*, (1998), Kristensen *et al.*, (1981), en ambos casos miden la repuesta celular y humoral después de la vacunación con *M. hyopneumoniae*, sin llegar a una integración total de los datos. Al igual que Strasser *et al.*, (1992) al relacionar, supuestamente, las reacciones inmunológicas con las patológicas en una infección experimental con *M. hyopneumoniae*, sólo hacen la descripción de los eventos.

Este es un estudio citométrico en el pulmón *in situ*, que revela una activación significativa durante los primeros días de las células CD4+ y se marca una tendencia de aumento de las células CD8, lo que coincide con un aumento de la lesión tanto microscópica como macroscópica. Sin embargo, no permite establecer cual fue el mecanismo empleado por el micoplasma para causar tal efecto. CD8 ha sido relacionado como indicador de lesión patológica en el pulmón como lo demuestran Lujan *et al.*, (1995), quienes correlacionaron en forma significativa los linfocitos presentes en lavados broncoalveolares y sangre, en ovinos infectados con el virus de maesdi-visna, con lesiones pulmonares, pero lamentablemente, en este trabajo por el escaso número de animales no se demostró esta relación.

En el presente trabajo se observó una significativa elevación de las células CD4+ en los primeros ocho días, lo cual pudiera explicar la elevación de los anticuerpos del día 12. La correlación entre el título de anticuerpos por ELISA y la producción de lesiones y tos, ha sido demostrada anteriormente por Bahanson, *et al.*, (1994) y Sørensen, *et al.*, (1994). Estos últimos, además, marcan el inicio de la seroconversión al día 8, lo que en un momento dado, pudiera estar relacionado con el alto nivel de CD4 observado en el día 8 en este estudio. El comportamiento de las células CD8+ demostró

una significativa diferencia, que explicaría el grado de lesión pulmonar. Sin embargo, se mantiene la interrogante de cómo el micoplasma realiza la estimulación linfocitaria, lo que probablemente esté dado por alguna proteína de excreción o factor membranal, ya que en un estudio previo, en nuestro laboratorio, Díaz *et al.*, (1996), con el fin de determinar las proteínas producidas durante las fases de crecimiento en 10 días consecutivos de cultivo de *M. hyopneumoniae*, determinó que la presencia del mayor número de proteínas excretadas fue en el noveno día de la cinética, este hecho aunque *in vitro* puede que tenga relación con las condiciones encontradas en el pulmón al día 8, donde encontramos el máximo nivel de células CD4 y CD8.

Un aspecto de llamar la atención, el día 8 las células CD4 (en cuentas totales) y CD8 (cuentas totales y densidad) , son los máximos valores encontrados y marca el inicio del agrupamiento de los cilios y a la vez la activación del BALT y otros elementos celulares. Es posible que a partir de este día, el micoplasma ejerza una doble acción, primero sobre la destrucción de los cilios y la otra liberando proteínas o toxinas que inicien la modulación de la respuesta celular, estos hallazgos de agrupamiento en los primeros estadios de la enfermedad coinciden con los trabajos de Blanchard *et al.*, (1992) y Mebus and Underhal,(1977).

El aumento de las células CD4 y CD8 no se reflejó en el número de micoplasmas, es decir, se incrementaron las CD4 y CD8 y los micoplasmas no disminuyeron, se mantuvieron en el mismo número, lo que no es comprensible, dado que, para el caso de las CD8 que van en aumento, producirían una disminución de estos por su carácter citotóxico y no fue así. Sin embargo, los títulos de aislamiento son similares en los tiempos postinfección a los mostrados por Ross *et al.*, (1984) y Young *et al.*, (1990), quienes manejan el concepto de unidades cambiantes de color utilizadas en este trabajo, para medir la concentración de micoplasmas aislados de muestras pulmonares.

Hasta el momento hemos hablado sólo de la infección producida con el micoplasma únicamente, ahora nos referiremos, a los cerdos 10 del día 16 y 12 del día 20, quienes sufrieron la interacción entre el micoplasma y *Pasteurella multocida*. Los niveles de CD4 y CD8 sufrieron un repunte que se manifestó al día 20. El aumento de CD4 no se reflejó en los niveles de ELISA contra el micoplasma, posiblemente porque los anticuerpos producidos son en contra *P. multocida*, pero esto no fue medido. El aumento de células CD8, si se reflejó en la producción de lesión pulmonar dado que el

cerdo 10 presentó 39.8% y el 12, 36.4% . A nivel histopatológico estos cerdos fueron quienes mostraron los cuadros más severos (ver Cuadro 4)

Con respecto a la fluorescencia, el día 16, es la máxima observada en el experimento en el cerdo 10, junto con el agrupamiento de los cilios, es decir, que se tiene inactivado al mecanismo de remoción dado por el cilio, lo que permitió el establecimiento de *Pasteurella multocida*.

P. multocida va a causar una severa neumonía, después de que los mecanismos de defensa han sido paralizados, como ocurrió al día 16 en este experimento, incrementando la severidad de las lesiones macroscópicas, histopatológicas y clínicas, como ha sido observado por otros autores (Fuentes y Pijoan, 1987, Ciprián *et al.*, 1988, Amass *et al.*, 1994), sin embargo, no existe hasta el momento en la literatura una descripción de la participación de las células CD4 y CD8 en un proceso de interacción de este tipo.

Las infecciones duales que pueden causar enfermedades respiratorias han sido el punto de atención durante los últimos años. Las múltiples infecciones entre virus, bacterias y micoplasmas han sido estudiadas bajo condiciones experimentales y de campo, encontrando como común denominador, la complicación y aumento de la severidad de los cuadros neumónicos. Así tenemos como ejemplos al de *Actinobacillus pleuropneumoniae* que se incrementa con influenza, Aujeszky y *M. hyopneumoniae* (Christensen *et al.*, 1999, Yaghihashi *et al.*, 1984), es por ello que no debe causar extrañeza lo que se encontró en este trabajo al aparecer *P. multocida*.

Uno de los problemas a los cuales se enfrentó este trabajo es la interpretación estadística de los resultados, ya que existió un bajo número de cerdos para el experimento. Sin embargo, al realizar la revisión de los trabajos relacionados con el tema donde se maneja la inmunohistoquímica, curiosamente se observa que tal vez los investigadores se encontraron con el mismo problema, dado que al interpretar los resultados lo manejan como tendencias y no como diferencias significativas, como es el caso del trabajo de Bhogal *et al.* (1994). Por otro lado, Bernd y Muller (1995), en un experimento similar pero con *Pasteurella multocida*, emplean dos animales infectados y un control, manejando los resultados de una manera cualitativa probablemente por el mismo problema de la estadística. Por el bajo número de animales, al tratar de correlacionar el

comportamiento de las células CD4 con títulos de ELISA y CD8 con lesión pulmonar, estos no fueron significativos, a pesar de que la tendencia marca una relación entre estos parámetros.

Después de llevar a cabo el análisis de los resultados obtenidos en este trabajo y tomando en cuenta los más recientes hallazgos, se puede continuar el estudio de los mecanismos inmunopatógenos de *Mycoplasma hyopneumoniae* tratando de dilucidar los siguientes aspectos:

Es necesario, ante todo, determinar la posible proteína o factor membranal que pudiera estar relacionada, siendo los posibles candidatos la proteína P65 (Young and Ross, 1987) o la P54 (Geary and Walczak, 1985), como ha sido demostrado para la proteína 97 (Hsu and Minion, 1998) sus características de citoadherencia a los cilios pulmonares porcinos.

Con el conocimiento de dicha proteína, sería necesario establecer un modelo experimental en cerdo, para demostrar las características del superantígeno de este micoplasma, siguiendo los pasos de Cole y Taquin (1991) para demostrar el superantígeno MAM de *M. arthritis*. Otro aspecto es el hecho que los superantígenos están involucrados con el fenómeno de apoptosis para células T (Tizard, 1998), lo que probablemente estaría relacionado con el fenómeno de inmunosupresión sugerido por algunos autores como Caruso (1990).

Por otro lado, en las infecciones por micoplasmas las lesiones sugieren que estas se producen tanto por su invasión como por su papel inmunomodulador, las cuales se caracterizan por una extensa inflamación de tejido linfóide asociado al sitio de la lesión, considerándose que este infiltrado se debe a la interacción de componentes de los micoplasmas con el tejido linfóide, logrando la inducción de algunas citocinas como son el factor de necrosis tumoral (TNF), Interleucina 1 (IL-1), Interleucina 6 (IL-6) (Heberlin *et al.*, 1994, Kyostal *et al.*, 1994,), hecho que ha comenzado a ser visto por autores como Asai *et al.*, (1994), para *M. hyopneumoniae*. Esta estimulación de citocinas podría estudiarse en un principio con cultivos de micoplasmas, después con membranas y finalmente con algunas lipoproteínas (Romero, 1998).

La producción de citocinas está relacionada con las dos subclases de células CD4 como son T_H1 y T_H2 . La participación de células T_H1 ha sido esclarecido para *Listeria*, *Actinobacillus*

pleuropneumoniae y *Streptococcus suis* a través de la detección de interleucinas como el interferón gamma, para lo cual Tacher *et al* (1998) han desarrollado la prueba ELISPOT para detectar la citocina interferón gamma en cerdos infectados con *M. hyopneumoniae* para una aplicación diagnóstica, sin embargo la participación de las células T_H1 o T_H2, es aún desconocida, lo cual sería otro aspecto a dilucidar.

Un aspecto que no se ha visto claramente y que estaría relacionado con este trabajo por la elevación significativa de las células CD4, durante los primeros estadios de la enfermedad, es el hecho de que se producen altos títulos de anticuerpos demostrados por ELISA, que se correlacionan con el grado de lesión pulmonar, siendo que gran parte de estos anticuerpos contra *Mycoplasma hyopneumoniae*, reaccionan en forma cruzada con el pulmón del cerdo, lo cual ha involucrado a esta enfermedad con fenómenos de autoinmunidad, hecho que no ha sido completamente esclarecido (Pijoan, 1995).

Con lo que en la solución a este rompecabezas inmunológico, es posible encontrar la respuesta a los mecanismos inmunopatológicos de esta enfermedad, para su aplicación en el tratamiento, diagnóstico y control.

7. CONCLUSIONES

Se analizó la reacción de las células CD4+ y CD8+ en la neumonía producida por la inoculación intratraqueal de *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos convencionales y se encontró :

- Mediante la Prueba de ELISA Tween 20 se observó una activación de respuesta humoral a partir del día 4, siendo en el día 12 el máximo título obtenido.
- El día 8 marca el máximo nivel de células CD4 y CD8, se relaciona el inicio del agrupamiento de cilios, el inicio de la seroconversión y la activación del BALT.
- De acuerdo a los resultados de este trabajo *M. hyopneumoniae*, activa significativamente a los linfocitos CD4+ y CD8+, en los primeros días de la enfermedad.

8. APENDICES

APENDICE 8 A

Cepas de referencia y medios de cultivo de micoplasmas.

Las cepas de micoplasmas utilizadas en este trabajo fueron las siguientes: *Mycoplasma hyopneumoniae* cepa 194 proporcionada por el Dr. Ross de la Iowa State University (E.U.A.), *Mycoplasma flocculare*, cepa Ms 42, donada por el Dr. Carlos Pijoan A. de la University of Minnesota (E.U.A.)

Medios de cultivo para micoplasmas

Medio HP "Hyopneumoniae" modificado por Friis.(Friis,1969,1971;ayb,1977, Boughton and Thorns, 1975, Ciprián, 1989) :

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 cerdo	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 (10X).

Agregar en el orden descrito :

NaCl	80	gr.
KCl	4.0	gr.
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.0	gr.
MgCl ₂ .6H ₂ O	1.0	gr.
Ca ₂ Cl	1.4	gr
NaH ₂ PO ₂ 12 H O	0.9	gr
KH ₂ PO ₄	0.6	gr.
Agua desionizada hasta	1000	ml.

Extracto de levadura.

Se suspendieron 50 gr de levadura fresca de panadería en 100 ml de Solución Buffer de Fosfatos pH7.0. 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. El medio de Friis se ajustó con NaOH 1 N a un pH de 7.4. El extracto de levadura y el suero se esterizaron 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.

Este medio fue empleado en el cultivo de las cepas de referencia para la producción de biomasa, así como en el aislamiento de micoplasmas de pulmones neumónicos.

Medios y pruebas de diferenciación bioquímica para micoplasmas.

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 aseptícamente los siguientes compuestos estériles :

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

Los micoplasmas se sembraron en medio de arginina y se incubaron a 37 C de 5 a 7 días junto con medios sin inocular que sirvieron como controles. Una reacción alcalina, de color púrpura indicó hidrólisis positiva (Boughton y Torns, 1975).

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.

Los micoplasmas se sembraron en los medios de Friis líquido con glucosa, se incubaron de 5 a 7 días, medios sin sembrar se utilizaron como controles. Una acidificación dio color amarillo-anaranjado indicando una reacción positiva.

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.

Los micoplasmas se sembraron en medio sólido de Friis, inmediatamente después se colocaron sobre la superficie de los discos impregnados con digitonina y se incubaron a 37 °C en una atmósfera de aire con CO₂ al 10% durante 5 a 7 días. Una zona de inhibición indica sensibilidad hacia la digitonina y presencia de esteroides (Friis, 1975).

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 Del medio de Friis con colonias de micoplasmas se cortaron trozos de agar de aproximadamente 1 cm y se colocaron sobre un portaobjetos. De la mezcla de glóbulos rojos y azul de metileno diluido 1 : 10 con solución salina amortiguada, se agregaron dos gotas sobre el agar con colonias y después de aproximadamente 5 minutos se observó al microscopio. La reacción positiva se observó cuando los eritrocitos de alrededor de las colonias se colorearon de azul (Roberts y Pijoan, 1977).

APENDICE 8 B.

Prueba de ELISA TWEEN 20

Se obtuvo el antígeno de *Mycoplasma hyopneumoniae* Tween 20 para ser empleado en la Prueba de ELISA de acuerdo a lo recomendado por Freeman *et al.* (1982), Nicolet (1980) y Sands (1982), para poder llevar a cabo la evaluación del título de anticuerpos de los cerdos del experimento.

Material y Reactivos.

Kit ELISA Mate KPL (Kierkgaar and Perry 1994. No. Cat. 546200) que contiene las siguientes soluciones :

- a. Solución amortiguadora de recubrimiento concentrada.
- b. Solución BSA (albúmina sérica bovina) diluyente bloqueadora concentrada.
- c. Solución de lavado concentrada.
- d. Sustrato de peroxidasa ABTS(2- 2 azino-di-3 ethalbenzothiazolin sulfone- 6)
 1. Sustrato de peroxidasa.
 2. Sustrato de peroxidasa B.
- e. Solución inhibidora de peroxidasa concentrada.

Conjugado anti IgG porcina peroxidasa (Sigma, Immunochemicals No Cat. A-9417)

Microplacas de poliestireno de 96 pozos de 350 μ l. (Nuclon).

Espectrofotómetro (Beckman DV-64).

Cepas de Micoplasmas

Para la preparación del antígeno Tween 20 fue utilizada una cepa de *M. hyopneumoniae* aislada de un pulmón con Neumonía Enzoótica, la cual fue identificada por prueba de inhibición de crecimiento por los autores de este trabajo. La cepa Ms42 de *M. flocculare* (proporcionada por el Dr. Pijoan Universidad de Minnesota, U.S.A.), fue utilizada para la preparación de antígeno de suero hiperinmune porcino.

Cultivo de los micoplasmas:

Tanto la cepa de *M. hyopneumoniae* y la cepa Ms42 de *M. flocculare* fueron inoculados en 2 litros de medio de Friis (1971), los cuales se incubaron a 37°C en agitación a 70 rpm y las células fueron cosechadas en la fase exponencial del cultivo (pH 6.8) Después fueron centrifugados a 20,000g por 20 minutos a 4° C y lavadas tres veces con 0.25 M de NaCl. Las células fueron resuspendidas a 1/200 del volumen original en 0.25 M NaCl y conservadas a -20° C.

Preparación del Antígeno Tween 20 de *M. hyopneumoniae*:

Del cultivo de *M. hyopneumoniae* conteniendo 3 mg. de proteína fue resuspendido en 3 ml. de Buffer de fosfatos (0.0125 M., pH 7.1) conteniendo 1% (v/v) de Tween 20 e incubado a 37° C por 90 min. en agitación. Después el cultivo fue centrifugado a 48,000 xg durante 60 min. a 4° C y el sobrenadante obtenido fue filtrado en membrana Millipore de 0.22 µ y conservado a -20° C. Esta preparación fue designada como antígeno Tween 20.(Nicolet,1980). Se determinó la concentración de proteína la cual fue de 648 microgramos por ml.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)

Tanto la cepa como el antígeno Tween 20 fueron separados por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (PAGE) al 13 %. Las proteínas fueron teñidas con azul de Coomasie. Para la prueba solo se consideraron aquellas bandas mayores a 30 kD, lo que corresponde a las proteínas del *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Sueros.

El control positivo es un suero hiperinmune contra *Mycoplasma hyopneumoniae* (*Mhp*) que fue obtenido de un cerdo SPF inoculado de acuerdo a un esquema modificado sugerido por Young y Ross (1987), elaborado por los autores (ver APÉNDICE 8 C).

El control negativo fueron sueros de dos cerdos SPF. Para la determinación de las reacciones cruzadas fueron obtenidos sueros contra *M. hyorhinis* proporcionado por la Universidad de Iowa. Así mismo fue elaborado en un cerdo libre de enfermedades respiratorias el antisuero contra *M. flocculare* de la misma manera que *Mhp*. Para la determinación de los límites negativos fueron utilizados 41 sueros negativos de campo y 27 sueros positivos donados amablemente por el Q.B.A.

Abraham Massa (Laboratorio de Patología Animal, SARH, la Piedad Michoacán, México) y el Dr. Antonio Morilla (INIFAP-SARH, Centro Experimental, Irapuato, Gto. México) los cuales fueron evaluados previamente en un kit comercial de origen europeo.

Determinación de la Concentración óptima del Antígeno Tween 20.

La dilución óptima del antígeno fue determinada por el empleo del método de diluciones dobles dimensional (Ajedrez) sobre una microplaca de 12 carriles de la siguiente manera:

1. Se colocó 100 μ ls del diluyente consistente en solución sensibilizadora de las columnas 2 a la 12.
2. Se colocó 200 μ ls en la columna número uno del antígeno Tween 20 a partir de una dilución de 1: 2048 equivalente a 356 ng por ml..
3. Se transfirieron 100 μ ls. de la columna 1 a la 2. Mezclar cuidadosamente pipeteando de 3 a 5 veces.
4. Se repitió el paso 3 hasta llegar al final de la placa. Se descartaron los 1000 μ ls. finales después de mezclar la columna 11. La columna 12 sirvió como control.
5. Se dejó incubando toda la noche a 4 °C.
6. Se realizaron diluciones dobles del antisuero contra *M. hyopneumoniae* de la línea A a la G, la línea H sirvió como control.
7. Se incubó una hora a temperatura ambiente.
8. Se lavó con solución de lavado.
9. Se aplicaron 100 μ ls. de la solución de revelado o sustrato (ABTS).
10. Se aplicaron 300 μ ls. de la solución de paro o Stop a los 15 minutos.
11. Se realizó la lectura de la placa a 405 nm.

Determinación de la dilución óptima del suero de trabajo.

Para la determinación de la dilución óptima de trabajo empleando la técnica anteriormente descrita se diluyeron los 21 sueros negativos, el control positivo, el suero SPF y suero de conejo en 1:50 y 1:100 respectivamente.

Prueba de ELISA Tween 20 con los sueros de campo y del experimento final.

Aplicación del antígeno Tween 20.

1. Se sensibilizaron placas con 100 μ ls. del antígeno de *Mycoplasma hyopneumoniae* Tween 20 a una dilución de 1: 30000 durante toda la noche a 4 ° C en solución sensibilizadora.
2. Se retiró el antígeno excedente.
3. Se bloqueó la placa con solución de albúmina sérica bovina al 1% aplicando 300 microlitros a cada pozo y se dejó incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Se retiró la solución bloqueadora.

Aplicación del suero de campo

1. Las muestras del suero fueron diluidas previamente en 1:100 y adicionadas a las placas.
2. Después de 1 hr. de incubación a temperatura ambiente fueron lavadas.

Aplicación del anticuerpo secundario.

1. Se les adicionó 100 μ ls. de un conjugado anti IgG porcino de conejo marcado con peroxidasa (Sigma Immunochemicals) a una dilución de 1:2000.
2. Después de 1 hr. de incubación fue lavada la placa.
3. Se adicionó 300 μ ls. de una solución de sustrato consistente en ABTS (2-2azino-di-3 ethalbenzothiazolin sulfone-6) [sal de diamonio] y peróxido de hidrógeno.
4. Después de 15 min. la reacción fue detenida con ácido sulfúrico al 3N.
5. Las placas fueron leídas a una absorbancia de 405 nm.

RESULTADOS

Gel de poliacrilamida:

Después de realizar la electroforesis en gel de poliacrilamida fueron visibles 9 bandas, que fluctuaron de los 10 kD a los 66 kD.

Determinación de la Concentración óptima del Antígeno Tween 20.

De acuerdo a los resultados obtenidos se determinó que la concentración adecuada del antígeno era de 1:30000 equivalente a 20 ng de proteína por pozo.

Determinación del la dilución óptima del suero de trabajo.

Se determinó que la dilución óptima de trabajo de los sueros es de 1:100.

Reacción cruzada con otras especies de *Mycoplasma*:

La reacción cruzada del antígeno con otras especies de *Mycoplasma*, tales como *M. hyorhinis* y *M. flocculare* no fue detectada como se observa en el Cuadro 11.

CUADRO 11 . Resultado de la reacción cruzada de la prueba ELISA TWEEN 20.

Suero	Lectura de densidad óptica (405 nm)
SPF	0.078
Anti	
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	1.335
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	0.0115
<i>Mycoplasma flocculare</i>	0.150

Determinación del valor negativo

El total de los sueros tanto negativos como positivos fueron sometidos a la prueba de X^2 . El valor negativo de los sueros de campo fue determinado en un rango de 0.391 a 0.625, mientras que los positivos se encontraron dentro de un rango de 0.803 a 1.124, también se observó que el rango para los sueros de animales S.P.F. fue de 0.0 a 0.667 y el rango del suero hiperinmune contra *Mycoplasma hyopneumoniae* fue de 1.024 a 1.552. Los resultados del estudio estadístico comparando el antígeno producido con un kit comercial demostró que no existió diferencias entre ambas pruebas (Hernández, 1998).

APENDICE 8 C.

OBTENCION DE SUEROS DE REFERENCIA Y PRODUCCION DE SUEROS HIPERINMUNES.

El objetivo de esta sección fue obtener antisueros que fueron empleados para varios propósitos.

El primero fue obtener un antisuero de origen porcino contra *Mycoplasma hyopneumoniae* el cual fue empleado para la elaboración de los conjugados de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa, así mismo sirvió como control positivo en las prueba de ELISA. Por otro lado se inocularon conejos para la producción de antisuero, el cual serviría en la implementación de la prueba de inhibición de crecimiento, que es una prueba inmunológica de identificación de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Se produjo el antisuero de *Mycoplasma flocculare*. con la finalidad de tener el juego completo de antisueros contra los principales micoplasmas porcinos (*M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* y *M. flocculare*) así como un reactivo más en la prueba de ELISA para detectar reacciones cruzadas y demostrar la especificidad de la prueba.

Sueros de Referencia

Fueron donados amablemente por el National Veterinary Laboratorys (NVLS Ames Iowa) Universidad de Iowa, E.U.A., los siguientes antisueros de origen porcino contra *Mycoplasma hyopneumoniae* (referencia 900-9215) y *Mycoplasma hyorhinis* (referencia :900-9214).

Producción de Sueros Hiperinmunes.

Suero hiperinmune contra *Mycoplasma hyopneumoniae*

Para la producción de suero hiperinmune contra *Mycoplasma hyopneumoniae* se emplearon los siguientes animales: 2 Cerdos S.P.F. proporcionados por el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (I.N.I.F.A.P.-S.A.R.H.) y 20 Conejos Nueva Zelanda de aproximadamente 1.5 kg, proporcionados por el Módulo de Conejos del Centro de Enseñanza Agropecuaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Estos animales fueron serológicamente negativos a *Mycoplasma hyopneumoniae* (por ELISA Tween 20), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (por Pleurortests) y *Pasteurella multocida* (por prueba de aglutinación en placa).

Los cerdos y los conejos se inocularon con *Mycoplasma hyopneumoniae* cepa XHMP5, a una concentración de 10^6 UCC/ml. inactivado con adyuvante oleoso, donado amablemente por el Dr. Dayalu de Smith Kline Animal Healt (U.S.A.).

Para la inmunización se siguió un calendario sugerido por Young y Ross(1987) en donde se aplicaron 2 ml. por vía Intramuscular los días 1, 4, 7 y en igual dosis pero por vía Intrapertoneal los días 22 y 28. Los animales se sacrificaron a los 40 días.

Para el sacrificio del animal fue sedado con asaperona (2mg/ kg de peso, vía intramuscular) y anestesiado con clodhidrato de metomidato (1.5 mg/kg de peso, vía intravenosa) después se sangró recibiendo la sangre en recipientes estériles y se dejó reposar 24 hr a 4°C. El suero fue centrifugado y depositado en frascos estériles y almacenados a -20 °C hasta su uso.

Para la inmunización de los conejos Nueva Zelanda, se manejaron varios tipos de inmunización y se tomó la decisión de evaluar cinco calendarios; los tres primeros se resumen en el siguiente Cuadro 12.

CUADRO 12. CALENDARIO DE INMUNIZACION DE LOS CONEJOS

1			2			3		
No. de conejos	6		4			4		
Día	Dosis	Vía	Día	Dosis	Vía	Día	Dosis	Vía
1	1 ml.	SC	0	1 ml	IP	1	2 ml	ID
21	1 ml	SC	1	1 ml	IP	22	1 ml	IM
42	1 ml	SC	2	1 ml	IP	36	1 ml	IM
63	1 ml	SC	3	1.5 ml	IM	43	1 ml	IM
64	1 ml	SC	4	1.5 ml	IM	50	SACRIFICIO	
84	1 ml	SC	5	1.5 ml	IM			
89	SACRIFICIO		6	1.5 ml	IM			
			48	1.5 ml	IM			
			55	1.5 ml	IM			
			60	SACRIFICIO				

1: Kinkert y Cols. (1985) 2: Janson R.(1974) 3: Williams y Taylor Robinson (1977)

El calendario 4 propuesto por Williams y Taylor-Robinson,(1967) consiste en aplicar 1 ml. de antígeno en forma intradérmica en diferentes sitios, tres semanas después 1 ml de antígeno intramuscular en diferentes sitios. Tres semanas mas tardes se toma una muestra sanguínea con

el fin de verificar los títulos de anticuerpos, se aplica 1 ml de antígeno intramuscular y a la semana siguiente se sacrifica.

El calendario 5 se tomó de Pijoan (1973) el cual consistió en aplicar semanalmente durante cuatro semanas cantidades ascendentes de 1 a 5 ml de antígeno, después de la cuarta semana se dejan descansar los conejos 2 semanas y después se les aplica 5 ml de antígeno en forma intramuscular. Después de 3 ó 4 días se sacrifica al conejo.

Al concluir los calendarios de inmunización los animales fueron anestesiados y se obtuvo su sangre por punción cardíaca, la sangre así obtenida fue depositada en tubos estériles y se dejaron los tubos 24 hrs a 4 °C, seguidamente el suero fue centrifugado y depositado en alícuotas para su almacenamiento a -20 °C hasta su uso.

Titulación de los sueros producidos

Para la titulación se empleó la prueba de ELISA Tween 20 modificada para sueros de conejos: Para ello se realizaron diluciones dobles de los sueros y conjugado anti IgG de conejo peroxidado hecho en cabra, el cual fue titulado previamente para su uso como a continuación se describe.

Titulación del conjugado anti IgG de Conejo Peroxidado.

Material

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

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

Método

Para la titulación del conjugado anti IgG peroxidado se empleó el método de diluciones doble dimensional (mejor conocido como ajedrez) sobre una microplaca de 96 pozos como a continuación se describe :

1. Se colocó 100 µls. del diluyente consistente en solución sensibilizadora de las columnas 2 a 12.
2. Se colocó 200 µls. en la columna número uno del suero de conejo.

3. Se transfirió 100 µls. de la columna 1 a la 2. Se mezcló cuidadosamente pipeteando de 3 a 5 veces.
4. Se repitió el paso 3 hasta llegar al final de la placa. Se descartaron los 100 µls. finales después de mezclar la columna 11. La columna 12 sirvió como control.
5. Se dejó incubando toda la noche a 4 °C.
6. Se realizaron diluciones del conjugado de la línea A a la G. La línea H sirve de control.
7. Se incubaron 1 hr. a temperatura ambiente.
8. Se realizaron lavados con solución de lavado.
9. Se aplicaron 100 µls. de la solución de revelado o sustrato (ABTS).
10. Se aplicó solución de paro a los 25 minutos.
11. Se realizó la lectura de la placa a 405 nm.

De acuerdo a los resultados obtenidos de las lecturas se consideró que la dilución óptima a usarse es de 1:3200 de anti IgG de conejo peroxidado y el tiempo de lectura era a los 25 minutos.

Titulación de los sueros de los conejos.

Aplicación del Antígeno.

1. Se sensibilizaron placas con 100 µls. del antígeno Tween 20 de *Mycoplasma hyopneumoniae* producido en este trabajo (ver producción del antígeno Tween 20 de *M. hyopneumoniae* pag. 75) a una dilución 1:30000 toda la noche a 4 °C en solución sensibilizadora.
2. Se retiró el antígeno excedente.
3. Se bloqueó la placa con solución bloqueadora aplicando 300 µls. a cada pozo y se dejó incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Se retiró la solución bloqueadora.

Reacción del suero de conejo (anticuerpo primario)

1. Se realizaron diluciones dobles del suero de conejo ocupando 16 pozos por muestra, haciéndose por duplicado.
2. Se incubó una hora a temperatura ambiente.
3. Se lavó con solución de lavado durante 5 minutos.

Aplicación del anticuerpo secundario

1. Se aplicó el anticuerpo secundario (anti IgG de conejo peroxidado) a una dilución 1:3,200, se aplicó 100 µls. a cada pozo de cada dilución del suero.
2. Se incubó 1 hr. a temperatura ambiente.
3. Se lavó con solución de lavado durante 5 minutos.

Aplicación del Sustrato.

1. Se aplicaron 100 µls. de la Solución sustrato ABTS a cada pozo.
2. Se incubaron 25 minutos a temperatura ambiente.
3. Se aplicaron 100 µls. a cada pozo de la solución de paro.

El último pozo que presentó color se consideró el título del suero.

Resultados.

Del cerdo libre de enfermedades respiratorias se obtuvo aproximadamente 2 litros de antisuero con un título de 1 : 12046.

De los conejos se obtuvieron un total de aproximadamente 300 ml. de antisuero de conejo, cuyos títulos de los diferentes protocolos de inmunización utilizados fueron los siguientes: para el protocolo uno todos del conejos presentaron un título de 1 :256, con excepción de uno (1:768), del protocolo 2 todos tuvieron un título de 1:1024. Del protocolo 3 un conejo presentó un título de 1:512 y otro de 1:1024, tanto los conejos del protocolo 4 y 5 presentaron títulos de 1:2046.

Se determinó que los calendarios 4 y 5 fueron los que produjeron mejores títulos de anticuerpos y que estos esquemas de inmunización son aconsejables en la producción de antisuero contra *M. hyopneumoniae*.

Producción de suero hiperinmune contra *Mycoplasma flocculare*.

Fue empleado un cerdo destetado de aproximadamente 10 kg. proveniente de una granja libre de enfermedades respiratorias ubicado en el Municipio de Zumpango, Estado de México.

Fue utilizada la cepa de referencia Ms42 de *Mycoplasma flocculare* proporcionada amablemente por el Dr. Carlos Pijoan de la Universidad de Minnessotta (U.S.A.).

La cepa Ms42 de *Mycoplasma flocculare* se inoculó primero en 10 ml de medio de Friis, incubándose por 72 hrs a 37 °C y posteriormente se hicieron cultivos en 250 ml., y después en 500 ml. que se incubaron a 37 °C en agitación a 70 rpm y las células fueron cosechadas en la fase exponencial del cultivo (pH 6.8). Después fueron centrifugados a 20,000xg por 20 minutos a 4 °C y lavadas tres veces con 0.25 M de NaCl. Las células fueron resuspendidas a una concentración de 1.200 del volumen original a 0.25 M NaCl y conservadas a -20 °C.

Para la inmunización contra *Mycoplasma flocculare* Ms42 se siguió el protocolo modificado de Young y Ross (1987) Se aplicó por vía intramuscular a una dosis de 2 ml. del antígeno de *Mycoplasma flocculare* con adyuvante completo de Freund, a una concentración de 10^6 UCC/ml los días 1 y 7. Después por la misma vía y a la misma dosis pero aplicando solo el antígeno del micoplasma los días 14,20,26,29 y 41. El día 51 se llevó a cabo el sacrificio. Para la titulación del antisuero se realizó la técnica de ELISA modificada empleando para ello como antígeno la cepa de *M. flocculare* a una concentración de 10 ng. por pozo

Resultado.

Del cerdo inmunizado se obtuvo aproximadamente 2 litros de antisuero cuyo título fue de 1:2046 y la lectura de ELISA Tween 20 fue de 0.150, de lo cual significa que no tuvo reacción cruzada contra *M. hyopneumoniae*.

APENDICE 8 D.

PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA

Con el fin de determinar la presencia de *M. hyopneumoniae* en el tejido pulmonar se desarrolló el conjugado de fluorescencia para ser utilizado por el método directo de acuerdo a lo recomendado por Ciprián (1982), Cruz (1991), Erno(1977), Morilla (1986) y Sánchez Vizcaino (1990).

Material y reactivos.

Sephadex G-25 : Para su preparación se pesó una pequeña cantidad de Sephadex en polvo, se añadió a un matraz y se le adicionó PBS. 7.4. No se debe añadir excesiva cantidad de Sephadex en el matraz (proporción 1/10 con relación al PBS), pues al absorber gran cantidad de agua, puede dificultar su posterior manejo. Una vez hinchado, se agitó fuertemente y se dejó sedimentar. Se decantó el sobrenadante y se lavó tantas veces como fue necesario hasta obtener un pH final de 7.4. Para su conservación se completó la botella con PBS y se le añadió mertiolato al 1/10,000.

Polvo de hígado: Para su preparación se tomó un hígado o fracción de un animal joven y se eliminó toda clase de tejido fibroso, dejando únicamente el parénquima. Se cortó en pequeñas fracciones de 1 a 2 cms. de lado aproximadamente y se lavó con agua de la llave varias veces, hasta que quedó transparente. Se trituró finalmente con un turmix. El triturado se añadió a una probeta y se mezcló con 4 volúmenes de acetona fría, se dejó que sedimentara o se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos. Al sedimento se le añadió nuevamente acetona haciendo una suspensión homogénea. Se dejó que sedimentara nuevamente, se retiró la acetona sobrenadante, se añadió nueva acetona y se repite la operación hasta que el sobrenadante este totalmente claro. Tomar el sedimento y colocarlo en un embudo buckner con un papel filtro Watman acoplado a un kitasato con vacío. Una vez desecado se recogió el polvo, se puso en placas de Petri y se dejó a 37 °C. durante toda la noche. Después se trituró en un mortero lo más finamente posible, se pasó a través de doble gasa y se almacenó herméticamente cerrado a 4 °C hasta su uso.

Conjugación.

Se preparó una solución de 5 mg/ml de isotiocianato de fluoresceína en tampón carbonato.

Se añadió 1 ml. de la solución de fluoresceína a 1 ml de una solución de 100 mg/ml. de IgG purificado proveniente del suero del cerdo vacunado contra *Mycoplasma hyopneumoniae* en PBS, lentamente y en agitación. Se incubó a 4 °C toda la noche y en agitación constante. Se comprobó que el pH de la reacción se mantuviera en 9 se corrigió con NaOH 0.04 M. El tubo debió ser opaco, para evitar la luz o tapado con papel aluminio.

Eliminación del isotiocianato no conjugado.

Se tomó un matraz y se añadieron 100 ml. de la suspensión de Sephadex equilibrado a pH 7.4. Se lavó 3 veces con PBS para eliminar el merthiolate.

En una columna de 50 cm de alta y 1 - 1.5 cm de diámetro interior, se añadió Sephadex para obtener un lecho de 30 cm. de altura. El pH de la columna debió ser de 7.4. Se evitó siempre que la columna se secarae o se fraccionara. Se añadió el conjugado lentamente cuando el PBS estaba finalizando su paso sobre la superficie del lecho. Cuando el conjugado haya penetrado en el Sephadex, se le añade PBS 7.4. Se observó que en la columna se forman tres bandas, una inferior correspondiente a las "gamaglobulinas conjugadas", una central clara y una superior de color intenso formada por el isotiocianato no conjugado. Cuando empezó a salir el conjugado por la parte inferior de la columna, se recogió hasta que solamente saliera PBS sin coloración, después se envasó en frascos viales color ambar estériles.

Eliminación de la fluorescencia inespecífica.

Se tomó 100 mgs. de polvo de hígado por cada ml. de conjugado obtenido por la columna. Se añadió a un tubo de centrifuga junto con PBS (10 veces su volumen). Se mezcló homogéneamente y se centrifugó a 1,500xg durante 10 minutos y se decantó el PBS.

Seguidamente se añadió el conjugado al polvo de hígado y se dejó en agitación constante durante toda la noche a 4°C. Pasado este tiempo, se centrifugó a 40,000xg durante 30 minutos y se recogió el sobrenadante. Posteriormente este tiempo, se centrifugó a 40,000xg durante 30 minutos y se recogió el sobrenadante. Se añadió mertiolate al 1/10,000, y se repartió en viales de 0.5 ml. y se conservó a - 20 °C.

Titulación del conjugado.

La titulación se realizó en dos partes, una con células de *M. hyopneumoniae* y la otra con cortes de tejido pulmonar obtenidos con el crióstato. Para la primera titulación se hicieron diluciones dobles del conjugado 1:1 a 1:128 y se aplicaron sobre frotis de colonias de *M. hyopneumoniae* para cada dilución del conjugado. A cada frotis se le colocó una gota del conjugado de la dilución correspondiente, se incubaron los frotis en cámara húmeda a 37 °C por 60 minutos. Después se lavaron con agua destilada y se dejaron secar. Posteriormente se observaron en un microscopio de fluorescencia Carl Zeiss, binocular, WL equipado con condensador de campo oscuro y lámpara de vapor de mercurio HB 22 W/4. Al momento de su utilización se emplearon un filtro de excitación azul (BG12) y un filtro de barrera 50.

Posteriormente se tituló el conjugado utilizando cortes de tejido pulmonar obtenidos en el crióstato. Se utilizaron como controles negativos un pulmón fetal y un pulmón sin lesiones macroscópicas de un cerdo de 6 meses de edad. Como control positivo se empleó un pulmón de un caso clínico con lesiones características de neumonía enzoótica, del cual se realizaron varios cortes para cada dilución del conjugado. Las muestras pulmonares de aproximadamente 1 cm³ de los lóbulos apicales.

Uso del Crioprotector

Para mantener la integridad bronquiolar y evitar que el epitelio mucociliar se desprendiera durante el manejo de las muestras, primero se empleó el crioprotector denominado Tissue Tek y también se elaboró un crioprotector a base de polietilenglicol (200 mls. de polietilenglicol más 500 ml. de agua destilada) se distribuyó en frascos para coleccionar muestras conteniendo 50 ml. del crioprotector y se esterilizaron en autoclave. Se congelaron a -70 °C y en ellos se coleccionaron los fragmentos de pulmones durante la necropsia. Se conservaron en congelación a -70 °C.

Se realizaron cortes de 8 micras de grueso en el crióstato a -20 °C, se colocaron en portaobjetos de vidrio desengrasados, después se secaron al aire durante unos segundos y fueron fijados en acetona fría (-20°C) durante 10 minutos. Se secaron nuevamente y se les aplicó la dilución correspondiente del conjugado, se incubaron durante una hora en la cámara húmeda, se escurrieron y se lavaron con PBS e inmediatamente se observaron al microscopio de fluorescencia como anteriormente se describió.

Reaislamiento del microorganismo.

A partir de los pulmones utilizados para la prueba de inmunofluorescencia se intentó el aislamiento del micoplasma. Las muestras pulmonares fueron obtenidas asépticamente y de los lóbulos anteriores se preparó un homogeneizado pulmonar al 10% (p/v) en el medio de Friis con morteros Ten-Broeck. Con este homogeneizado se prepararon diluciones en una serie de tubos también con medio de Friis hasta la dilución 10^5 y se incubaron de cinco a siete días a 37 °C, posteriormente se sembraron en medio sólido y fueron nuevamente incubados a 37 °C a una atmósfera de 10% de CO₂, posteriormente se observó la morfología colonial y se realizaron pruebas para su identificación.

Comparación del conjugado elaborado con uno de referencia.

Con la finalidad de hacer una evaluación entre el conjugado producido y el de referencia se realizó un experimento de doble ciego. Se tomó como control positivo una muestra de campo procedente del valle de Texcoco, a la cual se le realizó el aislamiento positivo de *Mycoplasma hyopneumoniae* y que resultó positivo a la prueba de fluorescencia, como control negativo se empleó un pulmón de cerdo de aproximadamente 2 meses de edad proveniente de una granja libre de enfermedades respiratorias ubicada en el Municipio de Zumpango, Estado de México, los cuales fueron conservados en crioprotector (Tissue Tek) y congeladas a -20 °C.

Se empleó el conjugado de referencia proporcionado por el National Veterinary Laboratories (NVLSL, Ames, Iowa) con número de catálogo 9020DBL8903 en una dilución de 1:49, así mismo se empleó el conjugado elaborado en la F.E.S. Cuautitlán, a las diluciones 1:16, 1:32 y 1:64.

Tanto la preparación de las muestras y la técnica de tinción fueron realizadas como se describió con anterioridad. Para la lectura de las laminillas se utilizó la técnica de doble ciego y se realizó la lectura por 3 diferentes técnicos especializados con el fin de evitar una influencia en el resultado. Posteriormente los resultados fueron analizados según el método de Tukey con un 95% de confianza.

Resultados.

Rendimiento de la producción de suero hiperinmune y conjugado.

De cada uno de los cerdos inmunizados se obtuvieron aproximadamente 2 litros de suero hiperinmune, de los cuales 200 ml. fueron empleados en la elaboración del reactivo y se obtuvieron aproximadamente 50 ml. de conjugado fluorescente.

Titulación del conjugado.

La titulación del conjugado con improntas de la cepa 194 de *M. hyopneumoniae* mostró un título óptimo de 1:32. La titulación en cortes pulmonares mostró que la dilución óptima era de 1:16. Hasta esta dilución pudieron apreciarse los focos fluorescentes de color verde amarillentos adheridos al epitelio mucociliar.

Aislamiento de *M. hyopneumoniae*.

De los pulmones estudiados, solo se aisló micoplasma a partir de las lesiones características de neumonía enzoótica. el aislamiento fue tipificado como *M. hyopneumoniae*. Solo en este pulmón se observó fluorescencia específica. Los resultados se muestran en el Cuadro 13.

CUADRO 13. Correlación entre aislamiento y fluorescencia en los pulmones estudiados.

Tipo de muestra Pulmonar	Resultado del aislamiento de <i>M. hyopneumoniae</i>	Observación de específica.
FETAL	NEGATIVO	NEGATIVA
NORMAL	NEGATIVO	NEGATIVA
LESION NEUMÓNICA	POSITIVO	POSITIVA

Comparación del conjugado elaborado y el de referencia.

Los datos obtenidos fueron analizados según el método de Tukey con un 95% de confianza encontrándose que ambos conjugados son equivalentes.

APENDICE 8 E.

PRUEBA DE INMUNOPEROXIDASA DIRECTA

Con la finalidad de tener una prueba alterna a la prueba de inmunofluorescencia y con el fin de detectar la presencia de *M. hyopneumoniae* en tejido pulmonar fue implementada la prueba de inmunoperoxidasa de acuerdo a lo recomendado por Bruggman (1977), Doster (1988), Harlow and Lane (1988) y Sánchez Vizcaino (1990).

Reactivos

Para acoplamiento de la peroxidasa por medio del peryodato de sodio.

Peroxidasa de rábano: Horseradish (tipo VI) Sigma EC 1.11.1.17 (P-8375) Lote 53h9588

Sefadex G 25 fino.

Soluciones reguladoras y otras :

PBS

Solución reguladora carbonato bicarbonato de sodio 1 M. pH 9.5.

Peryodato de sodio 0.1 M : Hacer una solución de 21 mg/ml. en agua destilada.

Etilenglicol 1 M : Diluir 1 ml. de etilenglicol puro en 17 ml. de agua destilada.

Borohidruro de sodio : hacer extemporáneamente una solución de 4mg/ml en agua destilada.

Para Técnica de Inmunoperoxidasa.

Metanol absoluto con 0.1% de peróxido de hidrógeno.

Agua destilada

TBSE : 0.05 M Tris HCL, 0.15 M de NaCl, 1 mM de ácido edético (EDTA), pH 7.4.

Sustrato : Tetrahidrocloruro de Diaminobenzidina (DAB Sigma).

Solución reguladora de Tris HCL 0.1 M pH 7.6.

Peróxido de hidrógeno al 3%.

Producción del Conjugado.

Los pasos que se siguieron en la elaboración del conjugado de peroxidasa fueron los siguientes:

1. Se disolvieron 2 mg. de peroxidasa en 0.5 ml. de peryodato de sodio 0.1 M.
2. Se agitó 20 minutos a temperatura de laboratorio.
3. Se añadieron 30 microlitros de etilenglicol 1 M para bloquear la acción del peryodato en exceso y agitar 5 minutos.
4. Se filtró sobre una columna de Sephadex G25 fino (1 X 5 cm), equilibrada con la solución reguladora carbonato-bicarbonato 0.1 M, pH 9.5 y recuperó la fracción café.
5. Se añadieron 8 mg de anticuerpo previamente dializado contra NaCl 0.15 M.
6. Se adicionaron 0.1 ml. de la solución reguladora carbonato bicarbonato 1 M.

7. Después de 2 horas a la temperatura del laboratorio, se añadieron 0.2 ml de borohidruro de sodio 4 mg/ ml.
8. Se dejó 2 horas y se dializó la preparación contra PBS.
9. Centrifugar la preparación 15 minutos a 10,000 xg en vial eppendorf.
10. Se repartió en alícuotas de 1 ml. en viales estériles.
11. Se guardar a -20°C .

Titulación del conjugado.

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

Para la titulación del conjugado a partir de células del micoplasma se empleó el método de diluciones dobles doble dimensional (mejor conocido como Ajedrez) sobre una microplaca de 12 carriles como a continuación se describe:

1. Se colocaron a cada pocillo 100 μl s. de solución de sensibilización
2. En la columna 1 se depositaron 100 μl s. del antígeno de micoplasma a una concentración inicial de 1 mg. de proteína por mililitro, a cada pozo de la columna 1 y se hicieron diluciones dobles.
3. Se incubó la placa toda la noche a 4°C .
4. Se retiró la solución de sensibilización.
5. A cada pozo se le aplicó 100 μl s. de TBSE.
6. A partir de la línea A se depositaron 100 μl s del conjugado (Se tomó un frasco de 100 μl s y se le adicionaron 2.4 ml. de TBSE o sea que se inició con una dilución del conjugado de 1:24).
7. Se realizaron diluciones dobles de la columna A a la G, dejando la H como control.
8. Se incubaron 60 minutos a 37°C .
9. Se hicieron dos lavados con TBSE.
10. Se colocó 100 μl s. de solución reveladora a cada pozo
11. Se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente.
12. Se aplicó 300 μl s. de la solución de paro a cada pozo
13. Se realizó la lectura a 405 nm.

Posteriormente se tituló el conjugado utilizando cortes de tejido pulmonar obtenidos en microtomo crióstato. Se utilizaron como controles negativos un pulmón fetal y un pulmón sin lesiones macroscópicas de un cerdo de 6 meses de edad. Como control positivo se empleó un pulmón el cual procedía de un caso clínico con lesiones características de neumonía enzoótica, positivo a la prueba de inmunofluorescencia, del cual se realizaron varios cortes para cada dilución del conjugado. Las muestras pulmonares fueron congeladas a -70°C y de ellas, se tomó aproximadamente 1 cm^3 , de los lóbulos apicales, procurando incluir bronquios y bronquiolos. Se realizaron cortes de 8 micras de grueso en el microtomo crióstato a -20°C , se colocaron en portaobjetos de vidrio desengrasados, después se secaron al aire durante unos segundos y fueron fijados en acetona fría (-20°C) durante 10 minutos, se utilizó la técnica siguiente.

Técnica de inmunoperoxidasa directa.

1. Se colocaron los cortes en metanol absoluto con 0.1% de peróxido de hidrógeno por 20 minutos para destruir la peroxidasa endógena.
2. Las laminillas se lavaron con agua destilada.
3. Se colocó una gota del conjugado de peroxidasa a cada laminilla.
4. Se incubó a 37°C durante una hora en cámara húmeda.
5. Se realizaron lavados con TBSE durante 15 minutos (tres cambios, una cada 5 minutos).
6. Se preparó el sustrato consistente en diaminobenzidina (DAB) de la siguiente manera:
 - a) Se adicionaron 5 mg de Diaminobenzidina en 10 ml. de Tris HCl al 0.1 M PH 7.6.
 - b) Se verificó el pH y se ajustó a 7.6 con sosa 1 N si era necesario.
 - c) Se filtró en papel filtro plisado o no (tipo Laurent o Whatman No. 1).
 - d) Se añadió 0.1 ml. de peróxido de hidrógeno al 3%.
7. Se vertió sobre los portaobjetos.
8. Se incubó 7 a 10 minutos.
9. Se enguajaron los portaobjetos con agua destilada.
10. Se montó la preparación entre porta y cubreobjetos con glicerol-gelatina.
11. Se observó en microscopio óptico.

Resultados.

Producción del conjugado.

Se obtuvieron 22 ml. de conjugado que fueron concentrados a 1.7 ml. es decir se concentraron 13.8 veces. A partir del 1.7 ml del conjugado se obtuvieron 16 viales de 100 μ ls. con una concentración total de proteína de 2.137 mg. / ml. o sea 0.213 mg / 100 μ ls. ó 213 microgramos/ 100 μ ls.

Titulación del conjugado.

Se determinó que la dilución del conjugado fue de 88.75 microgramos por ml. es decir una dilución de 1: 1536 y que la cantidad mínima detectada de antígeno es de 21.7 ng. / ml.

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

Prueba de inmunoperoxidasa

En cultivo.

La titulación del conjugado con improntas de la cepa 194 de *M. hyopneumoniae* mostró un título óptimo de 1: 16. Los organismos de *M. hyopneumoniae* de los frotis fueron vistos como pequeñas estructuras café rojizas.

En tejido pulmonar.

La titulación en cortes pulmonares mostró que la dilución óptima es de 1:8.en donde se apreciaron estructuras café rojizas adheridas al epitelio mucociliar.

En un estudio estadístico posterior, comparando el conjugado de inmunoperoxidasa producido y el de inmunofluorescencia por medio de la prueba de Tukey con un 95% de confianza se encontró que ambos conjugados eran homogéneos o iguales (Gutiérrez *et al.*, 1995).

9. LITERATURA CITADA.

- Adegboye D.S. (1978) A review of mycoplasma induced immunosuppression *Brit. Vet. J.* 134 : 536-556.
- Amass, S.F., Clark L.K., Uah Alstine, W.G., Boversock, T.L., Murphy D.A., Knox, K.E. and Albregta, S.R. (1994). Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida* infections in swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204: 102-107
- Armstrong C.H and Friis N.F (1981). Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from swine in the United States. *Am. J. Vet. Res.* 42 : 1030 -1032.
- Armstrong C.H. (1994): Porcine Mycoplasmas in *Micoplasmosis in animals : Laboratory Diagnosis*. Edited by Whitford . Rosenbusch in Laureman. *Iowa State University Press / Ames*. Cap. 6 First Edition. P 68-83.
- Armstrong C.H, Freeman.J. Sands-Freeman L. Lopez-Osuna M. Young T and Runnels L J. (1983). Comparison of the enzyme linked immunosorbent assay and the indirect hemagglutination and complement fixation test for detecting antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Can. J. Comp. Med.* 47: 464 - 470.
- Asai T. Okada M., Ono M., Mori Y., Yokomizo Y. and Sato S. (1994) Increased levels of tumor necrosis factor and interleukin 1 in bronchoalveolar lavage fluids from pigs infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Immun. Immunopath* 38: 253-260.
- Bahanson P.B., Marsh W.E. and Dial G.D. (1994) The associations among serology to *M. hyopneumoniae*, lesion at slaughter, and a clinical index of cough in groups of growing pigs. *Proceedings 13th Int. Pig. Vet. Soc.* 131.
- Bekoff, M.C. Cole, B.C., y Grey H.M. (1987) Studies on the mechanisms of stimulation of T cells by the *Mycoplasma arthritidis*-derived mitogen. Role of class II-IE molecules. *J. Immunol.* 139 : 3189-3194.
- Bennel, R.H. Jasper D.E. (1977) Immunosuppression of humoral and cell-mediated responses in calves associated with inoculation of *M. bovis* *Am. J. Vet. Res.* 38 : 1731-1735.
- Bernd A, Muller G. (1995) Occurrence of T lymphocytes in perivascular regions of the lung after intratracheal infection of swine with *Pasteurella multocida*. *Vet. Immun. Immunopath.* 49 : 143-159.
- Betts (1972). Les techniques gnotobiotique et leur application dans la eradication des maladies respiratoires du porc *Ann. Med. Vet.* 116: 319 - 330.
- Bhogal S.B., Dayalu I.K., Keich L.R., Rogers M.A., Gerber, D.J. (1994) Preferential stimulation of cell mediated immune (CMI) responses in bronchial lymph nodes of piglets vaccinated with a *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine. 12th IPVS Congress. The Netherlands. August. p 298.
- Blanchard B. Vena M.M. Cavalier A, le Iannie J., Gouraton J., Kobish M. (1992) Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Microbiol.* 30 : 329-341.

- Blood P.A. (1997) Ryfe ray cancer Treatment and micoplasmas in cancer and AIDS. <http://www.f.com.protech/blood3.htm/>
- Boughton L and Thorns C.J. (1975) *Mycoplasma laboratory handbook Ministry of Agriculture, Fisheries and Food Centrai Veterinary Laboratory New Haw :Weybridge. Surrey. England.*
- Brassine M. Dewaele A and Brower J. (1977). Influence de l'entendee des lesion pulmonaires sur lá croissance et homogeineita de pora a liengrais *Ann. Med. Vet.* 11: 155-174.
- Breider A.M., Kumar S and Corstvet E.R.(1991) Interaction of bovine neutrophils in *Pasteurella haemolytica* mediated damage to pulmonary endothelial cells. *Vet. Immun. Immunopat.* 27:337-350.
- Bruggman S. Keller H.(1977) Bertschinger H.U.and Engber B. Quantitativa detection on antibodie to *Mycoplasma suis pneumoniae* in pig sera by and enzime linked immunoabsorbent assay. *Vet. Rec.* 101: 109 -111.
- Bruggman B.E.Ehrensperger,F.(1977) Demostration of *M suis pneumoniae* in pig lungs by the enzime linke immunoperoxidase techniques. *Vet. Rec.* 101: 101-107.
- Burce D.G.S (1982) The incidence and distribution on lungs lesions associate with enzootic pneumonia in pig from farms and the effect on the extend of the lesions on weighth gains Procceeding Int.Pig Vet Soc. Congress Mexico p. 95 .
- Carding R.S., Hayday C.A. and Bottomly K. (1992) Cytokines in T – cell development. *Immun.Today.* 12 : 239-245.
- Caruso J.P and Ross R.F.(1990) Efect of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infections on alveolar macrophage functions in swine. *Am. J.Vet. Res* 51: 227-231.
- Catty D. (1989) Antibodies, a practical aprproach. Vol II . Edit. *Irl Press.* England
- Ciprián A.,Ochoa G., Pijoan C. (1978) Aislamiento de *Mycoplasma hyorhinis* a partir de pulmones neumónicos de lechones en México. Memorias de la Reunión Anual de Investigación en Medicina Veterinaria.
- Ciprián, C (1979) Aislamiento y caracterización de micoplasmas a partir de pulmones neumónicos de ovinos y caprinos de México Tesis de Maestra ENEP - INIP.
- Ciprián C.A. (1987) Interacción entre *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Pasteurella multocida* en las neumonias de los cerdos . Tesis Doctoral. FESC UNAM.
- Ciprián A., Cruz T.,and Pijoan C. (1982). Specific fluorecence against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pneumonic lungs on pigs in México. Procceeding Int. Pig. Vet. Soc. Congress. México p. 90.
- Ciprián.A. Pijoan,C., Cruz T. Camacho J.,Tórtora, J.Colmenares G., López R.R y De La Garza M. (1988). *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the suceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. *Can.J Vet Res* 52: 434 – 458.

- Ciprian A., Cruz T.A., and Garza M. de la (1994) *Mycoplasma hyopneumoniae*: Interactions with others agents in pigs and evaluation of immunogens. *Arch Med Res* 25:2: 235-239.
- Cole C.B. and Atkin I.A. (1991). The *Mycoplasma arthritis* T-cell mitogen, MAM : a model superantigen (1991) *Immun Today*, 12: 271 - 276 .
- Cowan S.T and Steel K.J (1974): Manual for the Identification of Medical Bacteria. Second edition Cambridge University Press Cambridge 1974.
- Christiansen G. (1992) Genetic Variation in natural populations in *Mycoplasmas*, Molecular biology and pathogenesis. Editor in chief Maniloff J. *American Society for Microbiology*. Washington D.C. U.S.A. p.569.
- Christensen N.H. and Culliname L.C.(1990) Monitoring the health of pigs in New Zeland abattoirs. *New Zeal Vet J.* 38 : 136 -141.
- Christensen, N.H. (1995) Evaluation of the effects of enzootic pneumonia in pigs on weight gain and days to slaughter under New Zealand conditions. *N Zeal Vet J.* 43: 146 -148.
- Christensen G, Sorensen V. and Mousing J. (1999) Diseases of the respiratory system in Diseases of Swinw. Edited by Straw B. *et al*, 8th Edition , Iowa State University Press. p. 913-940.
- Clark, Kirk L(1996) Respiratory Therapy. Implementing Cost effective Regimens.Swine Disease Conference for swine Practitioners. Iowa State University. Ames IA. November 14-15.p 83-87.
- Cruse M. And Lewis E.R. (1994) Ilustrated Dictionary of Immunology. C.R.C. U.S.A. p. 53-61 .
- Cruz S. T.A. (1991) Evaluación de dos inmunógenos de *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos convencionales. Tesis Maestría. FESC. UNAM.
- Dayalu K.I and Ross R.F(1990) Evaluation of experimental vaccines for control of porcine pneumonia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* *Procc Int Pig Vet.* 11: 83.
- Desrosiers R. (1998) Control of bacterial respiratory diseases. *Procc 15th Int.Pig Vet. Soc.* Vol II. Engalnd p.21.
- Diaz A.F.(1996) Purificación de proteínas de sobrenadantes de medios de cultivo de *Mycoplasma hyopneumoniae* y su efecto hemolítico. Memorias del XV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Octubre. Brasil. No. 1292.p.282.
- Djordjevic, S.P., Eamens, G.J., Romalis, L.F., Nicholls, P.J., Taylor, V. And Chin J. (1997) Serum and mucosa antibody responses and protection in pigs vaccinated against *Mycoplasma hyopneumoniae* with vaccines containinga denatured membrane antigen pool and adjuvant. *Aust. Vet. J.* 75:504-511.
- De Bey M.C., Jacobson C.D. and Ross R.R. (1992) Histochemical and morphologic changes of porcine airways ephitelial cells in response to infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.* 53: 1705-1710.

- Domenech, J., Poveda J.B., Fernández A., Valera, N. Porteo J.M., Villalba E.J., y Martín de Mulas (1993): Aislamiento e identificación de *Mycoplasma hyopneumoniae* a partir de lesiones neumónicas de cerdos de abasto. *Med. Vet.* Vol. 10.No. 6 p. 338-342.
- Doster, R.A. and Chang Lin B. (1988) Identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* on formalin fixed porcine lungs, using an indirect immunoperoxidase method. *Am. J. Vet. Res* 48: 1719-1721.
- Erno H. (1977) Mycoplasmas Use of polyvalent antisera for identification by indirect immunofluorescence. *Acta Vet.Scand.* 18: 176 -186.
- Etheridge J.R. Cotte G.S and Lloyd L.C. (1979a). Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from lesions of experimentally infected pigs *Aust Vet J.* 55: 356 - 359.
- Etheridge J.R and Lloyd L.C. (1979 b). A complement fixation test for Enzootic Pneumonia of pigs using a complement dilution method. *Aust Vet J.* 56: 101 - 105.
- Falks K.S (1990) : Enzootic pneumonia of pigs studies on fields 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.90.
- Fed N.C., Quist P., Ahrens P., Friis N.F., Meyling A. (1992) A monoclonal blocking ELISA detecting serum antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Microbiol.* 30: 35-46.
- Feldner J. Gobei U and Brendt W (1982): *Mycoplasma pneumoniae* adhesin localized to tip structure by monoclonal antibody. *Nature.* 298: 765-76.
- Friis N.F. (1969). *Mycoplasma suis pneumoniae* isolated in Denmark . *Acta Vet. Scand* 10: 295 - 297.
- Friis N.F. (1971 a) Mycoplasmas cultivated from the respiratory tract of danish pigs. *Acta Vet Scand* 12: 116 -119.
- Friis N.F. (1971 b). A selective medium for *Mycoplasma suis pneumoniae*. *Acta Vet Scand.* 12: 454 - 456.
- Friis N.F (1977). *Mycoplasma suis pneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* in the growth precipitation test. *Acta Vet. Scand.* 18: 168 - 175.
- Friis N.F. and Jensen P.(1974). Serological comparison of type strains of porcine bovine and ovine mycoplasmas with atypical colony morphology. *Acta Vet. Scand.* 25: 29 - 35.
- Freeman M.J. Armstrong C.H and Sands L.L. (1982). 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.
- Fuentes M.C. and Pijoan C. (1987) Pneumonia in pig induced by intranasal challenge exposure with pseudorabies virus and *Pasteurella multocida*. *Am. J. Vet. Res.* 48: 1446-1448.

- Geary S.J and Walczak E.M. (1985 a): Cytophatic of whole cells and purified membranes of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Infect Immun.* 41: 132-136.
- Geary S and Walczak E.M. (1985 b). Isolation of a cytophatic factor from *Mycoplasma hyopneumoniae* *Infect. Immun.* 48: 576- 578.
- Gergely P. (1992) The pathogenesis of autoimmune disease. *Immun. Today.* 13: 21-23.
- Giger T., Bruggman S., Nicolet J (1977) Immunological methods for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in frozen sections and bronchial smears. *Asweizer Archiv. Fur tennelkunde.* 119: 125-134.
- Goodwin R.F.W. (1965). The possible rol of hysterectomy and related procedures for the eradication and control of pig diseases in Britain. *Vet. Rec.* 77: 1070 -1076.
- Goodwin R.F.W.(1971). The comparative suceptibility of hysterectomy procesed calostrum deprived pigs and naturally born enzootic pneumonia free pigs to enzootic pneumonia. *J. Hyg. Camb.* 69: 391 - 397.
- Goodwin R.F.W.(1982) Isolation of *Mycoplasma suis pneumoniae* from the nasal cavites and lungs of pigs affected with enzootic pneumonia of exposed to this infection *Res. Vet.* 13: 262-267.
- Goodwin R.F.W, Whitestone P.(1973).Enzootic Pneumonia of pigs Immunization attempts inoculating *Mycoplasma suis pneumoniae* antigen by various routes and with differents adjuvants *Br. Vet. J.* 129: 456- 464.
- Gutierrez B.,Cruz S.T.A.,Aguilera C E. y Ciprián C(1995).Correlación entre las pruebas de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa para la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae*. XXX Congreso Nacional de la Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos. Agosto, Manzanillo, Colima, México.
- Harlow E. and Lane D.(1988) Antibodies. A Laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.USA.
- Hannan P.C T Banks R.M Bhogal B.S. Blanchflower S E Donald A.C Fish J.P and Smith D. (1984). Reproducible pneumonia in gnotobiotic piglets induced with broth cultures of *Mycoplasma hyopneumoniae* and the efect of animal passage on virulence. *Res. Vet. Sci.* 36: 153 - 163.
- Herbelin A. (1994) *Micoplasma arginini* Thu-14, membrane lipoproteins induce production of Interleujin-1, Interleukin-6 and Tumor necrosis factor by human monocytes. *Infect. Immun.* 62: 4690-4696.
- Hernández F. (1997) Ensayo de una prueba de ELISA para el diagnóstico de la Neumonía Enzootíca en México. Tesis de Licenciatura. FESC UNAM.
- Hernández J., Reyes-Leyva J, Zenteno R., Ramirez H., Hernández-Jauregui P., Zenteno E. (1998). Immunity to porcine rubulavirus infection in adult swine. *Vet. Immun. Immunopath.* 64: 367- 381.
- Hodges R.T. Bett A.O and Jennings A.R (1969). Production of pneumonia in gnotobiotic pigs with pure cultures of *Mycoplasma hyopneumoniae* . *Vet. Rec.* 84: 268 - 273.

- Holmgren, N., Gerth-Lofstedt, M., Bergstrom J. and Wallgren P. (1994) Prevalences of some respiratory pathogens in different piglets breeding systems. *Proceedings 13th Int. Pig. Vet. Soc.* 130.
- Hsu T. and Minion F.C. (1998) Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. *Infect. Immun.* 64: 4762-4766.
- Huang T.Y., Chu M.R., Liu S.R. and Weng N.C. (1990) Morphologic studies of intrapulmonary airway mucosa-associated lymphoid tissues in swine. *Vet. Immun. Immunopat.* 25: 13-22.
- Ibelgaufits H. (1999) Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia. <http://www2.lmb.unimuenchen.de/cgi-bin/cope.pl.2888>.
- Itraksa Y., Engel R and Switzer W.P. (1983). Pulmonary and hematologic changes in swine with *Mycoplasma hyopneumoniae* pneumonia *Am. J. Vet. Res.* 45: 474 - 477.
- Jansson R. (1974). Evaluation of some serological techniques for the identification of *Mycoplasma hyorhinis* and *Mycoplasma suis pneumoniae* *Acta Vet. Scand.* 15: 274 - 282.
- Kagnoff M.F. (1996). Mucosal Immunology: new frontiers: *Imm. Today.* 17: 57-59.
- Kazama S., Yagihashi I. And Seto K. (1989). Preparation of *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen for the enzyme linked immunosorbent assay. *Can. J. Vet Res.* 53: 176-181.
- Kemeny M.D., Noble A., Holmes J.B. and Diaz- Sánchez. (1994). Immune regulation: A new role for the CD8+ T cell. *Immunology Today.* 15: 107-110.
- Kenny E.G. (1992) Serodiagnosis. in *Mycoplasma diseases of animals in Mycoplasmas, Molecular biology and pathogenesis*. Editor in chief Maniloff J. *American Society for Microbiology*. Washington D.C. U.S.A. p.505-511.
- Kishima M. Ross R.F and Kuniyasu C. (1985) Cell mediated and humoral response to *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs enhanced by dextran sulfate. *Am. Vet. Res.* 46: 456 - 461.
- Kishima M. and Ross R.F. (1985). Suppressive effect of nonviable *Mycoplasma hyopneumoniae* of phytohemagglutinin induced transformation of swine lymphocytes. *Am. Vet. Res.* 46: 2366- 2368.
- Klinkert M., Herman R and Schaller H. (1985). Surface proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* identified from an *Escherichia coli* expression plasmid library. *Infect. Immun.* 49: 329-335.
- Kobish M. (1982). Serological identification of porcine mycoplasmas. *Int. Pig. Vet. Soc. Congress. México.* p. 93.
- Kyostal D. (1994) A 48 Kda *Mycoplasma fermentans* membrane, protein induces cytokine secretion by human monocytes. *Infect. Immun.* 62: 3793-3800.

- Kristensen B. Paros Ph. Nicolet J. Wanner M and Deweck A.L. (1981). Cell mediated and humoral immune response in swine after vaccination and natural infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* . *Am. J. Vet. Res.* 42: 784 - 788.
- Kuper F.C., Koomstra J.P., Hammelers H.M.D., Biewenga J., Spit J.B., Duijvestijn M.A., Van Breda Vriesman P.J.C. and Sminia T. (1992) The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunology Today* 13: 219-224.
- Lam K.M. and Switzer W.P. (1971 a). Mycoplasmal Pneumonia of Swine Development of and indirect hemagglutination test *Am. J. Vet. Rec.* 32: 1737 - 1741.
- Lam K.M and Switzer W.P. (1971b) Mycoplasmal Pneumonia on Swine Active and Pasive immunizations. *Am. J. Vet Rec.* 32: 1731 - 1736.
- Livingstone C.W. Stair E.L. Underhal N.R and Mebus C.A. (1972). Pathogenesis of mycoplasmal pneumonia in swine. *Am. J. Vet. Res.* 33: 2249-2258.
- Lloyd L.C. Badman T. Etheridge J.R. Kmckechnie and Byer H. (1984). Assesment of a complement fixation test to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. *Aust Vet J.* 61: 216 - 218.
- Lujan L., Begara I., Collie S.D.D., Watt J.N. (1995). CD8+ lymphocytes in bronchoalveolar lavage and blood : in vivo indicators of lung pathology caudex by maedi-visna virus. *Vet. Immun and Immunopath.* 49 : 89-100.
- Mc Lean W.I. and Kakane K.P. (1974) Peryodate-Lysine-Paraformaldehyde fixative .A new fixative for immunoelectron microscopy. *J. Histochem. and Cytochem.* 12 : 1077-1083.
- Magnusson U., Wilkie B., Mallard B., Rosendal S. and Kennedy B. (1998) *Mycoplasma hyorhinis* infection of pigs selectively bred for high and low immune response. *Vet. Immun. Immunopat.* 61: 83-96.
- Mebus C.A., Underhal N.R. (1977) Scanning electron microscopy of trachea and bronchi from pigs inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.* 38: 1249-1255.
- Messier S., Ross R.F. Paul P.S. (1990) Humoral and cellular responses of pig inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.* 51 : 52-58.
- Messier S. and Ross R.F. (1991) Interactions of *Mycoplasma hyopneumoniae* membranes with porcine lymphocytes. *Am. J. Vet. Res.* 52 : 1497-1502.
- Minitis O.P (1982) Gnotobiotic methods. *Proceeding Int Pig Vet Soc. Congress México* p 30:
- Mc Garrity J.G., Kotani H. and Butler H.G. (1992) Mycoplasmas and tissue culture cells. in *Mycoplasmas, Molecular biology and pathogenesis* Editor in chief Maniloff J. *American Society for Microbiology.* Washington D.C. U.S.A. p.445-456.

- Morilla G.A y Bautista G.R. (1986). Manual de Inmunología. Primera edición. Edit Diana. México p. 81-89..
- Morilla G.A.(1997) Enfermedades respiratorias de los cerdos de engorda en manual para el Control de las enfermedades Infecciosas de los cerdos. Edit. INIFAP-SAGAR y PAIEPEME. A.C. México D.F. p 37-85.
- Morrison R.B. Pijoan C. and Leman A.D.(1986):Association between enzootic pneumonia and performance.Pig News and Information 7: 23 - 31.
- Nicolet, J. And Paroz P. (1980) Tween 20 soluble proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* as antigen for an enzyme-linked immunoabsorbet assay. *Res. Vet. Scie.* 29: 305-309.
- Pabst B. (1992) Is BALT a major componenet of the human lung immune system ?. *Immunology Today* . 13:119-122.
- Pabst B. and Binns R.M. (1994) The immune sistem of respiratory tract in pigs. *Vet. Immun. Immunopat.* 43: 151-156.
- Pallares F.J., Gómez S., Ramis G., Muñoz A. (1998) Study of microscopical lesions foundin pigs vaccinated with Stellamune Mycoplasma and control in several productions systems. Procc. 15th Int. Pig Vet. Socc Birmingham England . p. 289.
- Pérez, J., Martín de las Mulas, Chacon De lara f., Gutiérrez Palomino P.N., Becerra Martel C., Martinez Moreno (1998) Immunochemical study of the local immune response to *Fasciola hepatica* in primarily and secondarily infected goats. *Vet. Imm. and Immunopat* 64: 337-348.
- Piffer A.I. and Ross R.F.(1983). Effect of age on suceptibility of pigs to *Mycoplasma hyopneumoniae* pneumonia..*Am J Vet Res* 45 : 478 - 481.
- Pijoan C: (1973) Studies of Mycoplasmas in relation to porcine respiratory diseases. PhD Thesis: *Univ. Of Surrey*
- Pijoan C. (1982):. Micoplasmosis en diagnóstico de las enfermedades del cerdo. Edit Pijoan y R Necochea p 522 - 531.
- Poonia B. And Sharma K.A. (1998) Modulation of lympho-proliferative responses of ovine peripheral blood mononuclear cells by *Mycoplasma mycoides ssp. mycoides*. . *Vet. Imm. and Immunopat* 64: 323-335.
- Purdie J.K. Hudson K. And Fraser D.J. (1991) Bacterial superantigens Chapter 10. Antigen Processing and Recognition. Ma Cluskey. *CRC Press USA*. p.193 214.
- Razin S.(1985). Molecular biology and genetics of mycoplasma Mollycutes .*Microbiol Rev* 49: 411- 455.
- Razin S.and Barile M.F.(1985) Mycoplasmal respiratory infections in the Mycoplasmas (Vol IV). Academic Press Inc. Harcourt Brace Jovanovich Publishers, Orlando Florida..USA
- Ro L.H and Ross R.F. (1983):Comparison of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains by serologic methods *Am J Vet Res.* 44 :2087- 2094.

- Roberts D.H (1972). Inhibition of lymphocyte transformation induced by phytohemagglutinin with porcine mycoplasma. *Br. Vet.* 128: 585 - 590.
- Rodríguez Ropon A. (1998) Evaluación del sistema inmune en lechones colonizados con un probiótico . Tesis Maestría. FESC. UNAM.
- Romero Rojas A. (1998). Estudio de las propiedades inmunomoduladoras de los *Mycoplasmas* Tesis Doctoral. FESC UNAM.
- Rosendal S., Levisohn S., Gallily R. (1995). Cytokines induced in vitro by *Mycoplasma mycoides ssp. mycoides*, large colony type. *Vet. Imm. and Immunopat.* 44: 269-278.
- Ross R.F. (1984). Chronic pneumonia of swine with emphasis of mycoplasma pneumonia. *Proceeding American Association of Practitioners.* U.S.A.
- Ross R.F. (1990). 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.
- Ross R.F., Zimmerman Erickson B. J. and Young F.T. (1984). Characteristics of protective activity of *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine. *Am.J.Vet.Res* 45: 1899-1904.
- Ross R.F. (1996) The role of mycoplasma in current respiratory disease outbreaks in finishing swine. Allen D. Leman Swine Conference. 23: 123-126.
- Roth A-J. (1999) The immune system in in Diseases of Swinw. Edited by Straw B. *et al*, *8th Edition* , Iowa State University Press. USA. p. 799-820.
- Saalmüller A. and Lunney K.J. (1998) Second International Workshop on Swine Leukocyte Differentiation antigens. Special issue. *Vet and Immunopat.* Volumen 60 .
- Saalmüller A. (1996) Characterization of swine leukocyte differentiation antigens. *Immun. Today* 17: 352-354.
- Sands LL, Freeman M.J, Armstrong C.H. (1982): Evaluation for the ELISA for diagnosis of mycoplasma pneumonia of swine (MPS Cross reactivity between *M.hyopneumoniae* and other porcine mycoplasma to reference antisera *Int Pig Vet Soc Congress México* p.91.
- Sanchez Vizcaino. (1990). Manual de laboratorio de Inmunología. Instituto nacional de Investigaciones Agrarias de Sanidad Animal: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Departamento de Sanidad Animal. Madrid, España.
- Shimizu M., Yamada S., Kawashima K., Ohashi S., Shimizu S., Ogawa T. (1995): Changes of lymphocyte subpopulations in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Vet. Immun. and Immunopath.* 50: 19-27.

- Schuller W. Swoboda R. Baumgarten W (1977): Comparisson of various laboratory methods for the diagnosis of enzootic pneumonia in swine. *Wiener Tieraerztliche Monateschrift*. 64: 236 - 241.
- Sharma R. and Woldehiwet (1991).Cytotoxic T cell responses in lambs experimentally infected with bovine respiratory syncytial virus. *Vet. Immun. and Immunopath.* 28: 237- 246.
- Simecka W.J., Davis K.J., Davidson K.M., Ross E.S., Stadtlander H.K.C., and Casell H.G. (1992). *Mycoplasma* diseases of animals in *Mycoplasmas, Molecular biology and pathogenesis*. Editor in chief Maniloff J. *American Society for Microbiology*. Washington D.C. U.S.A. p.391-416.
- Slavik M.F(1976). Adaptation of a latex agglutination tube test for diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae* swine pneumonia. *Diss. Abst. Int.* 378: 2703 - 2704.
- Slavik F and Switzer P. (1981). 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.
- Smith I.M., Hodges R.T., Betts, A.O. and Hayward , A. H.S. (1973). Experimental infections of gnotobiotic piglets with *Pasteurella septica* (sero-group A) alone or with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Comp. Path.* 83: 307-321.
- Sorensen V. Berdford K, Ahrenns P. Friis N.*et al.* (1994) Comparision of four differnts methods for demonstration of *M. hyoneumoniae* in lings os experimental inoculated pigs. Proceedings 13th International Pig Veterinary Society Congress. June Bagkokp, Thailand.p 188.
- Sorensen V. Berdford K, Fenestra A.A. and Feld. (1994) The humoral immune response to experimental *M. hyoneumoniae* infection in pigs in relation to clinical signs and pathological lesions. Proceedings 13th International Pig Veterinary Society Congress. June Bagkokp, Thailand.p 190.
- Sprent J.C. (1990) T Lymphocyte and the Thymus in Fundamental Immunology. Second edition. Edit E. *Paul Raven Press Ltd*. New York p. 69-92.
- Stevenson G. W. (1998) Bacterial pneumonia in swine. Proceedings 15th IPVS Congress Vol 1 England. P. 11-17.
- Stipkovits L(1995) Neumonía por Micoplasma en el cerdo en Enfermedades Respiratorias del Cerdo. Misset PIGS. Editor Vincent Joning. Holanda. Septiembre.
- Strasser M., Abiven P., Kobisch and Nicolet J. (1992). Immunological and pathological reactions in piglets experimetally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* and for *Mycoplasma flocculare*. *Vet. Immun. and Immunopat.* 31: 141-153.
- Summerfield A., Hofmann A.M., McCullough C.K. (1998) Low density blood granulocytic cells induced during classical swine fever are targets for virus infection. *Vet. Immun. and Immunopat* 63: 289-301.
- Suter M., Kobisch M. and Nicolet J (1985). 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.

- Thacker E.L. Thacker B.J. Boettcher T.B. Jayappa H. (1998) Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation, and protection induced by commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. *Swine health and Production*. 3: 107-102..
- Thacker L.E. (1998) Disease Mechanisms. An overview . How Microbes Cause Disease. Proceeding of the 15th IPVS Congress. Birminham England. July Invited Papers p. 95-101.
- Tajimá M. Yagihashi T. Nunoyá T (1985) Ultraestructure of mycoplasmal capsules of revealed by stabilization with antiserum and staining with ruthenium red. *Jpn. J. Vet. Sci* 47: 21 - 223.
- Tajimá M. Yagihashi T., Nunoyá T., Takeuchia Ohashi F (1983). *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs immunosupressed by thymectomy and treatment with antithymocyte serum. *Am. J. Vet. Res.* 45: 1928- 1932.
- Ternyck T and Avrameas (1969) Técnicas inmunoenzimáticas en Técnicas Inmunoenzimáticas. Editor Nicolas Grepe Editorial Iberoamericana: México cap. 4. p 53-63.
- Thomas B.C., Van Ess P., Wolfgram J.L., Rieba J., Sharp P. and Schultz R.D. (1991). Adherence to bovine neutrophils and suppresion of neutrophil chemituminescence by *Mycoplasma bovis*. *Vet Immun. and Immunopat.* 27 : 365-381.
- Tizard R.I. (1998). Inmunologia Veterinaria. 5^a. Ed. Edit. Mc. Graw Hill-Interamericana. México.
- Tryon V.V. and Baseman B.J. (1992). Pathogenic determinants and mechanisms in *Mycoplasmas*, Molecular biology and pathogenesis Editor in chief Maniloff J. *American Society for Microbiology*. Washington D.C. U.S.A. p.457-472.
- Vega-López M.A., Telemo E., Bailey M. Stevens K. And Stokes R.C., (1993). Immune cell distribution in the small intestine of the pig : Immunohistological evidence for an organized compartmentalization in the lamina propia. *Vet. Imm. and Immunopat.* 37 : 49-60.
- Vega-López M.A. (1994) Sistema immune del tracto respiratorio en Resúmenes del Simposio de Inmunología del Acorato Respiratorio. Edit. Ciprian *et al.* FESC UNAM. México. p 85-91.
- Williams, M.H. and Taylor-Robinson D. (1977) Antigenicity of *Mycoplasma* membranes. *Nature*: 215: 973-974.
- Whittlestone P. (1979). Immunity to mycoplasma causing respiratory diseases in man and animal. *Ad. Vet. Scien. Comp. Med.* 20: 277- 307.
- Yaghiashi T. Nunoya T. Mltui T. and Tajima M. (1984). Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection of the development of *Haemophilus pleuropneumoniae pneumoniae* in pigs. *Jpn. J. Vet. Sci.* 46 :700 - 713.
- Young F.T and Ross F.R. (1987). Assesment of antibody response of swine infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* by immunoblotting. *Am. J. Vet. Res.* 48 651-656.

- Young F.T., Ciang Yu-Wei and Ross F.R. (1990). Evaluation of local and systemic humoral responses to *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Proceeding Int. Pig. Vet. Soc.* p.97.
- Zuckerman F.A. I. Zsak, T.C. Mettenleiter and T. Ben Porat . (1990). Pseudorabies virus glycoprotein g III is major target antigen for murine and swine virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Virology*, 64 : 802-812.
- Zuckerman F.A. (1994) CD45 as a marker Porcine T cell differentiation. Resúmenes del Simposio de Inmunología del Aparato Respiratorio . *FES Cuautitlán U.N.A.M.* . México . p 9-18.
- Zuckermann A.F. *et al* (1998) Report on the analyses of mAb reactive with porcine CD8 for the second International Swine CD Workshop. *Vet. Imm. and Immunopat.* 60 : 291-103.