



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN.

“IDENTIFICACIÓN DE *Mycoplasma hyopneumoniae* EN
PULMÓN DE CERDO MEDIANTE LA TÉCNICA DE
INMUNOPEROXIDASA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
FEDERICO CANO NEPAUSENO

ASESOR: DR. TONATIUH A. CRUZ SÁNCHEZ
COASESORES : M. EN F. GERMAN ISAURO GARRIDO FARIÑA
M.V.Z MARCO ANTONIO MENDOZA SAAVEDRA.

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN



DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis :

"Identificación de Mycoplasma hyopneumoniae en pulmón de cerdo mediante la técnica de Inmunoperoxidasa"

que presenta el pasante: Federico Cano Nepauseno
con número de cuenta: 09722765-6 para obtener el título de :
Médico Veterinario Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 11 de Junio de 2008

PRESIDENTE Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo

VOCAL Dr. Tonatiuh A. Cruz Sánchez

SECRETARIO MVZ. Silviano Trejo Nuñez

PRIMER SUPLENTE MVZ. Raúl García Tinajero

SEGUNDO SUPLENTE Dr. Marco Antonio Muñoz Guzmán

AGRADEZCO A:

DIOS:

Por darme la oportunidad de realizar mi sueño desde niño; por mantener la salud, armonía y felicidad en mi hogar y cuidar a todas las personas que aprecio.

MIS PADRES JUAN CANO QUINTO Y AMELIA NEPAUSENO MONROY:

Por darme la oportunidad de pertenecer a esta familia tan especial; el esfuerzo y el apoyo que recibí durante mis estudios; y por enseñarme a valorar las cosas de la vida así como a la gente que está a mi alrededor.

MIS HERMANOS JUAN A., FRANCISCO, ELIZABETH, MAGALLY Y ULISES:

Por todos los momentos que pasamos juntos, aunque no han sido todos felices, los quiero mucho.

LA FAMILIA CONTRERAS GONZALEZ:

Por haberme permitido entrar en su casa e integrarme a su círculo familiar y quererme como uno más de ustedes. "Don fili, no lo olvido y cuídenos donde quiera que este"

MIS AMIGOS:

Por todo el apoyo que recibí en las aulas, la confianza que han depositado en mí y por sus experiencias, que me sirvieron de mucho para aprender un poco más de la vida.

MIS PROFESORES:

Por guiarme durante mi vida de estudiante, brindándome parte de su conocimiento y dándome consejos para llegar a ser un profesionalista de calidad.

MI AMIGA Y NOVIA MA. VICTORIA NIETO VAZQUEZ:

Por todo este tiempo que hemos pasado juntos y ojalá sea más; darme la mano cuando he tropezado e impulsarme a seguir adelante, gracias Flaky por tu amor y comprensión.

➤ ESTE TRABAJO FUE APOYADO POR EL PROYECTO PAPIIT IN 209-701 ANÁLISIS DE LAS POBLACIONES CELULARES DEL APARATO RESPIRATORIO ANTE LA INFECCIÓN DE MICOPLASMA Y LA CÁTEDRA DE INVESTIGACIÓN FESC-IN2-34

➤ POR LA CATEDRA DE INVESTIGACIÓN EN 1-45 DESARROLLADO, ADAPTACIÓN E INVESTIGACIÓN EN MICROTECNIA APLICADA A MICROSCOPIA FOTÓNICA.

INDICE.

1. RESUMEN	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 ANTECEDENTES.....	3
2.2 CARACTERÍSTICAS DE LA NEUMONÍA ENZOOTICA PORCINA.....	5
2.3 CARACTERÍSTICAS DE <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	7
2.3.1 Patogenia.....	8
2.3.2 Diagnóstico.....	11
2.4 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.....	13
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. HIPÓTESIS	17
5. OBJETIVOS	18
6. MATERIALES Y MÉTODOS	19
6.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	19
6.2 MATERIAL NO BIOLÓGICO.....	19
6.4 RESCATE ANTIGÉNICO.....	20
6.5 TÉCNICA DE INMUNOPEROXIDASA DIRECTA.....	21
6.6 TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA.....	21
6.7 EVALUACIÓN DE LAS PRUEBAS.....	22
7. DIAGRAMA DE FLUJO DEL EXPERIMENTO REALIZADO	23
8. RESULTADOS	24
9. DISCUSIÓN	30
10. CONCLUSIONES	32
11. BIBLIOGRAFÍA	33

1. RESUMEN

Este trabajo trata sobre el desarrollo e implementación de una técnica diagnóstica para *Mycoplasma hyoneumoniae*, la finalidad fue estandarizar la prueba de inmunoperoxidasa directa (IPD) como método de diagnóstico para la identificación de dicho microorganismo, para su evaluación se compararon los resultados obtenidos en una prueba de inmunofluorescencia directa (IFD) desarrollada por Flores y Luna (2008).

Se tomaron 25 pulmones de cerdo de diferentes granjas del estado de México con lesiones sugestivas de Neumonía Enzoótica Porcina. Se llevó a cabo la técnica de inmunoperoxidasa directa en las muestras obtenidas de los pulmones seleccionados, los cuales fueron comparados con datos pre-existentes de inmunofluorescencia y aislamiento.

En la prueba de inmunoperoxidasa directa (IPD) así como en la inmunofluorescencia directa (IFD), se observó la localización de marcaje positivo para *Mycoplasma* a nivel del epitelio mucociliar bronquial, en el caso de la IPD se puede ver corpúsculos de coloración café-rojizo y en el de IFD los corpúsculos son de color amarillo limón.

Los resultados obtenidos fueron comparados y son los siguientes: la técnica de inmunoperoxidasa directa tuvo una sensibilidad del 66.66 %, una especificidad del 18.75 % y una eficacia de la prueba de 36 %; y la técnica de inmunofluorescencia directa tuvo una sensibilidad del 100 %, una especificidad del 36.36 % y una eficacia de prueba del 56 %. Por los resultados obtenidos se puede concluir que la prueba de IFD tiene una mayor confiabilidad que la IPD, debido a que se toman en cuenta los resultados del cultivo, aunque es efectivo para un diagnóstico complementario, hay que tener en cuenta que debe estar presente la bacteria viva para su crecimiento.

2. INTRODUCCIÓN.

2.1 ANTECEDENTES.

Las enfermedades respiratorias en el cerdo, son muy comunes y distribuidas en todos los países y climas donde existe producción porcina intensiva (Straw y Zimmerman, 2002), involucrándose factores ambientales y de manejo para la presentación de ellas (cuadro 1).

Cuadro 1. FACTORES AMBIENTALES DE RIESGO ASOCIADOS A LA ENFERMEDAD RESPIRATORIA DEL CERDO EN EXPLOTACIONES INTENSIVAS (Lobo, 2008).

Características de la granja	Características del Manejo
<ul style="list-style-type: none">- Tamaño- Volumen de aire por Animal- Densidad de animales- Presencia de animales- Características de las madres- Tipo de granja (crianza v/s engorda)	<ul style="list-style-type: none">- Política de compras- Sistema de producción- Construcción- Operarios- Técnica de alimentación- Acceso al agua- Ventilación- Corrientes de aire- Tipo de pisos- Control de temperatura- Higiene- Movimientos de animales- Asesoría veterinaria
Parámetros del aire	Características de granjas vecinas
<ul style="list-style-type: none">- Temperatura- Humedad- Gases- Aerosoles	<ul style="list-style-type: none">- Distancia de una granja infectada- Tamaño- Densidad de cerdos en la región

Existen múltiples microorganismos que pueden afectar al aparato respiratorio del cerdo, entre las principales patologías respiratorias se encuentran: la Neumonía Enzoótica Porcina (*Mycoplasma hyopneumoniae*), la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina (*Actinobacillus pleuropneumoniae*), la Enfermedad de Glässer (*Haemophilus parasuis*), el Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (virus PRRS) y la Rinitis Atrófica del Cerdo (*Bordetella bronchiseptica* y *Pasteurella multocida*). Pero hoy en día se acepta que todo proceso respiratorio, es el resultado de una compleja interacción en la que pueden verse involucrados un gran número de agentes, por lo que habitualmente se ha hablado de un “Complejo Respiratorio Porcino” para referirnos a este tipo de problemas pulmonares de etiología múltiple, no obstante, actualmente se maneja el termino de “*Suis Ide Diseases*” para aludir a la complejidad de las etiologías y cuadros que intervienen en el tracto respiratorio del cerdo (Hans y Klaus, 2001).

En general, los cuadros subclínicos son los más frecuentes de encontrar. Entre los cuadros de presentación clínica destacan: las neumonías, las pleuro-neumonías y las pleuritis (Retamal, 2001).

Un hallazgo común en todas estas patologías es la participación de múltiples agentes infecciosos que se potencian en la inducción de la enfermedad, actuando como elementos predisponentes o favorecedores que tienden a acentuar los efectos dañinos en el animal y en la economía de la granja. Son agentes de alta infectividad, encontrándose en la mayoría de las granjas, y de una patogenicidad variable pero generalmente baja, dependiendo de las condiciones sanitarias, de manejo y de crianza particulares en cada situación (Retamal, 2001).

Se sostiene que, en general, la enfermedad respiratoria es la entidad patológica que genera las mayores pérdidas económicas en las granjas porcinas, debido a que los animales requieren de 2 a 3 semanas adicionales después del destete,

para alcanzar su peso óptimo de venta (\$ 6.5 a \$ 26.25 de costo adicional), el índice de conversión alimenticia (IC) disminuye en 0.1 puntos (\$ 18.9 por cerdo), disminuye la ganancia diaria de peso (5.7%) y genera una mortalidad adicional de un 7 a un 11 %. Este impacto es más severo cuando las patologías afectan a cerdos de menor edad, cuando se agravan por infecciones secundarias o cuando existen ambientes adversos y factores estresantes que debilitan la respuesta inmune de los animales (Retamal , 2001).

Aparte de las consecuencias económicas, existen dos aspectos muy importantes que conlleva la existencia de las enfermedades respiratorias:

- 1) Se afecta negativamente la salud del cerdo, y por lo tanto su bienestar.
- 2) Existe un impacto negativo en la salud pública, dado principalmente por:
 - a) Presencia de antibióticos en la canal, que se ha correlacionado positivamente con la existencia de lesiones pulmonares en estos animales.
 - b) Los ambientes que predisponen a la enfermedad respiratoria en los cerdos, también lo son para la enfermedad respiratoria en las personas que se desempeñan en esas granjas (operarios y veterinarios) (Retamal, 2001).

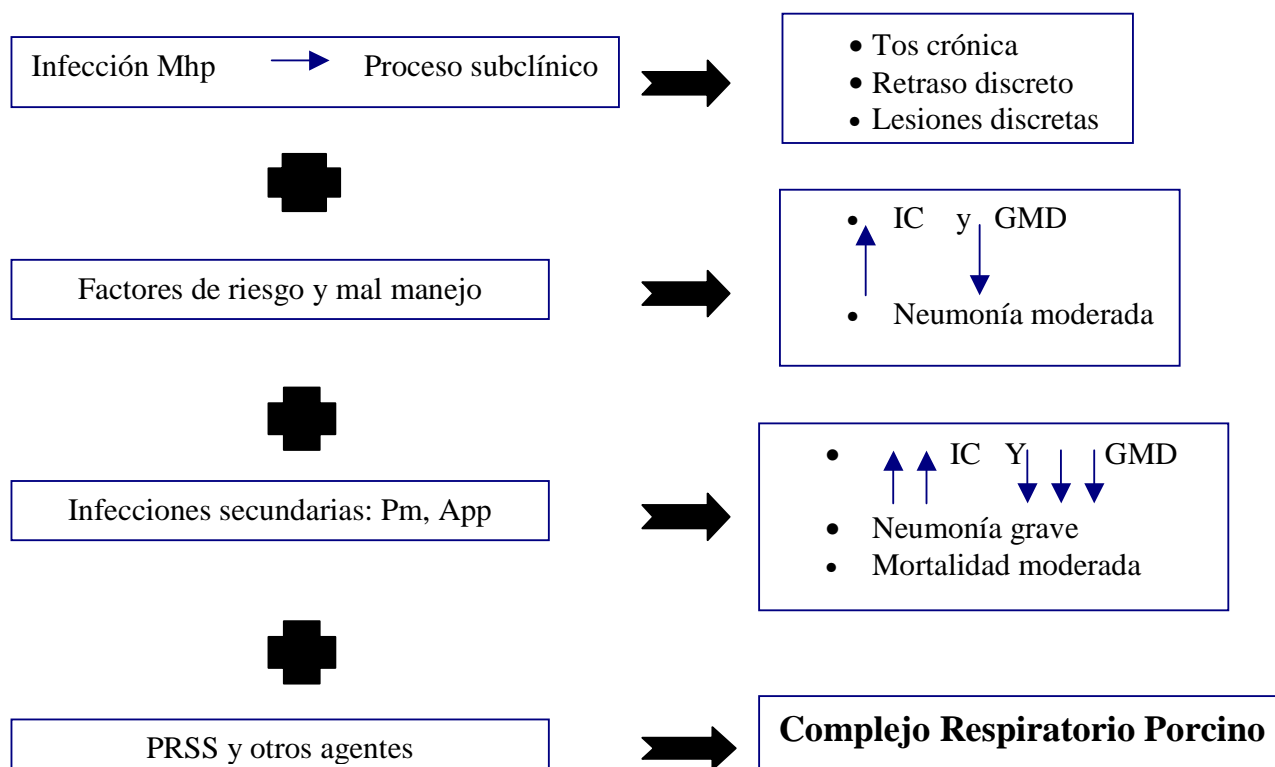
2.2 CARACTERÍSTICAS DE LA NEUMONÍA ENZOÓTICA PORCINA

La Neumonía Enzoótica Porcina (NEP) es un síndrome con baja mortalidad, difícil de controlar y su incidencia es mayor en la crianza de tipo intensiva, con grave impacto en los parámetros productivos en los cerdos de engorda, disminuyendo la ganancia diaria de peso y eficiencia de conversión (Hans y Klaus, 2001). Mare y Switzer (1965) en los Estados Unidos y Goodwin *et al* (1985) en Reino Unido aislaron *M. hyopneumoniae*. Desde entonces el papel de *M. hyopneumoniae* en la inducción de la neumonía crónica en cerdos a través del mundo continua siendo una problemática en la industria del cerdo(Calsamiglia, 2008).

La NEP es una enfermedad que por sí sola no causa un cuadro clínico severo, se caracteriza por la presencia de tos seca, sobre todo cuando los animales se agitan, ligero incremento en la temperatura, de 1 a 1.5 °C, y ocasionalmente ligeros escurrimientos nasales. En la mayoría de los casos la enfermedad pasa inadvertida por el personal encargado, favoreciendo su diseminación en las granjas (enzootias) y el estado crónico en algunos de los animales (Hans y Klaus, 2001).

En ausencia de otros patógenos, *Mycoplasma hyopneumoniae* puede no causar signos clínicos. El cuadro se complica cuando el *Mycoplasma* se asocia a otros patógenos respiratorios formando el denominado Complejo Respiratorio Porcino (cuadro 2). Este complejo, en el que intervienen tanto virus (virus de la enfermedad de Aujeszky, virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS), virus de la influenza porcina, circovirus porcino tipo 2) como bacterias (*Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*), ha emergido en la mayoría de países a pesar de las estrategias adoptadas en granjas de elevado estado sanitario y a pesar de la disponibilidad de vacunas para la mayoría de estas enfermedades (Lobo, 2008).

Cuadro 2. Dinámica de la Neumonía Enzoótica Porcina (Rodríguez, 2003).



2.3 CARACTERÍSTICAS DE *Mycoplasma hyopneumoniae*

Además de no tener pared celular lo cuál, le confiere un marcado pleomorfismo, este microorganismo es un residente natural del aparato respiratorio de los cerdos, pertenece al grupo de los micoplasmas que son nutricionalmente exigentes para su crecimiento, destacándose su extrema lentitud antes de observar cambios (ligera turbidez y cambio de color) que denuncien su presencia. Tiene un genoma pequeño (893 – 920 pares de kilobases, kb) (Ross, 1992).

Orden Mycoplasmatales:

- a) Familia I: **Mycoplasmataceae** (necesidad de esterol); hábitat: hombre y animales; género I: *Mycoplasma* (64 especies) y género II: *Ureoplasma* (2 especies), con actividad de ureasa.
- b) Familia II: **Acholesplasmataceae** (sin necesidad de esterol); hábitat: hombre y animales; género I: *Acholesplasma* (7 especies)
- c) Familia III: **Spiroplasmataceae** (morfología espiral, necesidad de esterol); hábitat: plantas e insectos; género I: *Spiroplasma* (3 especies) y géneros afines: *Thermoplasma* y *Anaeroplasma* (particularmente en los rumiantes) (Rodríguez, 2003).

El cultivo de *M. hyopneumoniae* resulta lento, en placas de agar se incuban normalmente entre 7 y 10 días, hasta que el crecimiento es aparente, aunque las colonias raramente son suficientemente grandes como para poder observarse a simple vista y su mayor crecimiento es en medios líquidos. Sólo prolifera en medios de cultivo complejos que contengan suero porcino o de caballo (como fuente de colesterol), extracto de músculo cardíaco, peptona y extracto de levadura como complemento nutritivo, los cuales se incuban en condiciones de microaerofilia (5-10% de CO₂) en los que se hacen visibles colonias al cabo de los siete días. A diferencia de otros *Mycoplasmas*, no producen las típicas colonias en forma de “huevo frito”, sino que las colonias son pequeñas, de 20 a 100µm de

diámetro, a los 10 días, y se caracterizan por carecer de “pezón central”: se describen como “gotas de rocío”(Rodríguez, 2003).

Además de los aspectos tratados anteriormente se ha descrito que la importancia de *M. hyopneumoniae* es múltiple ya que:

- a) Por sí mismo es capaz de provocar una alteración a nivel pulmonar lesionando gravemente el aparato mucociliar del cerdo predisponiéndole a enfermedades bacterianas y víricas.
- b) Puede escapar del sistema inmune y producir una fuerte reacción a nivel pulmonar que genera el acúmulo de células inflamatorias que provocan las lesiones características.
- c) Se ha demostrado experimentalmente en condiciones controladas que *M. hyopneumoniae* incrementa las infecciones tanto víricas como bacterianas y que es capaz de modular la respuesta inmune frente a otros patógenos.
- d) Este microorganismo desvía la respuesta inmunológica de tipo TH1, en el cual los macrófagos se activarían para fagocitar y destruir a los organismos, hacia una respuesta predominantemente TH2, la cual es probablemente menos efectiva en controlar y eliminar al organismo (Lobo, 2008).

2.3.1 Patogenia de la enfermedad.

La transmisión es lenta y principalmente ocurre por vía aerógena entre los animales. Se han propuesto tres mecanismos por los cuales la infección por *M. hyopneumoniae* se mantiene en una granja, son los siguientes:

1. Trasmisión de madres infectadas a lechones
2. De lechones infectados a otros
3. Transmisión de animales que están en cebadero a otros más jóvenes que entran a dichas instalaciones (Lobo, 2008).

El período de incubación varía entre 10 a 16 días o más, dependiendo de la dosis de infección. Ésta puede ocurrir en forma temprana pero hacerse evidente hasta los 3 a 6 meses de edad. En cuanto a los mecanismos de patogenicidad se ha señalado que una vez que se ha producido la infección del aparato respiratorio, *M. hyopneumoniae* se une a las células del epitelio de la traquea, bronquios y bronquiolos para evitar su expulsión mediante los sistemas que constituyen las barreras primarias, considerándose a esta capacidad una cuestión relacionada con la patogénesis de la Neumonía Enzootica.

Establecida la fijación a la mucosa, los *Mycoplasmas* producen citoquinas proinflamatorias y citotoxinas que limitan la respuesta inmune celular específica y local, e inducen un proceso inflamatorio inespecífico, mediante el factor de necrosis tumoral(FNT- α) produciendo de forma indirecta las lesiones a nivel ciliar y parénquima pulmonar (Huerta y Perea, 2008).

Por otra parte se ha referido la posibilidad de que ciertas proteínas de membrana se comporten como citoadhesinas. De igual manera la actividad hemaglutinante de una proteína de 64 kDa también podría relacionarse con la adherencia y la colonización en las células epiteliales. En el mismo sentido, el éstasis ciliar es una evidencia de la actuación patógena de estos agentes, que se relaciona con una proteína citotóxica y la presencia de peróxido de hidrógeno (Rodríguez, 2003).

En general, la apariencia de los lóbulos afectados es la de un pulmón atelectásico, su tamaño es igual o más reducido que el de un pulmón normal y su color es de rojo oscuro a púrpura (Blood y Radostis, 1992).

Las lesiones macroscópicas que presentan los pulmones de cerdos con Neumonía Enzootica Porcina consisten en áreas de consolidación púrpura a gris parduzco, generalmente aparecen bilateralmente en la porción ventral de los lóbulos apical y cardiaco, el lóbulo intermedio y la porción lateral del lóbulo diafragmático de los pulmones(fig.1) (Blood y Radostis, 1992).

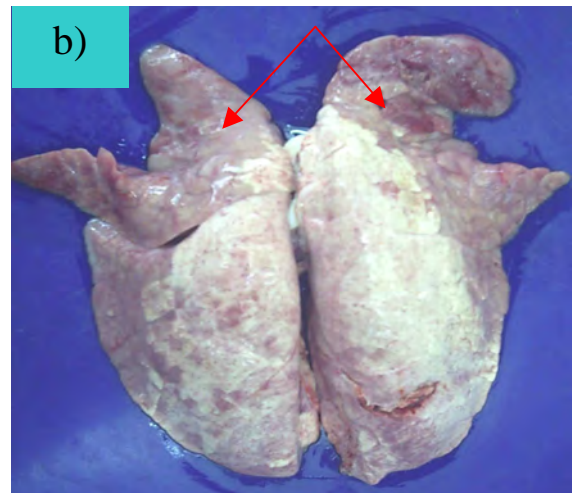
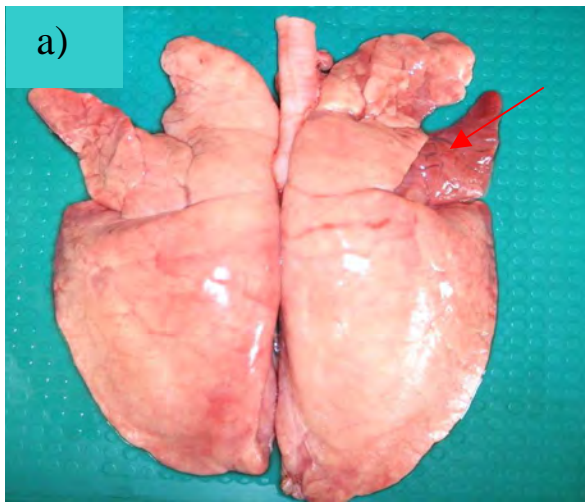


Fig 1. a)Pulmón de cerdo con lesiones características de *M. hyopneumoniae*. Nótese la congestión en el lóbulo craneal derecho. Fig. b) Pulmón con lesiones bilaterales en los lóbulos craneales y diafragmáticos (Cano, 2008).

Al examen microscópico se aprecia una neumonía catarral broncointestinal asociada con prominentes infiltraciones linfocitarias peribronquiales en etapas crónicas de la infección. En casos severos los acúmulos linfoides pueden presentar centros germinales y atrofian el músculo liso peribronquial, causando además estrechamiento del lumen bronquial. El epitelio bronquial presenta una hiperplasia marcada con pérdida de cilios, aunado a una dilatación de las glándulas de la submucosa, lo que produce un abundante exudado mucoso(fig. 2)(Blood y Radostis, 1992).

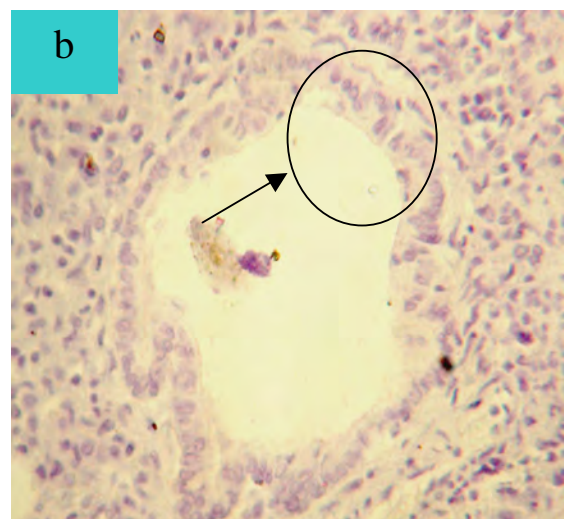
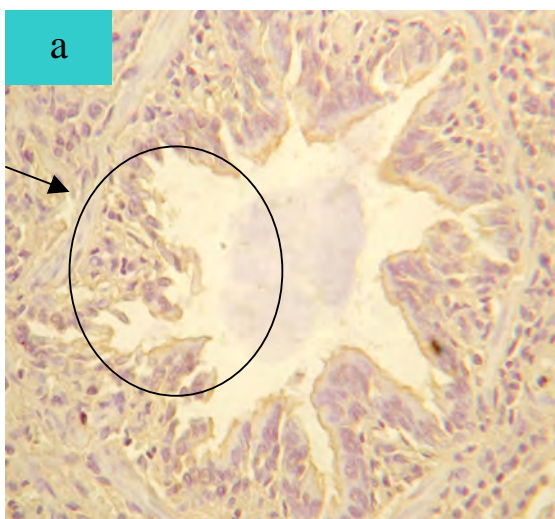


Fig. 2. a) Destrucción del epitelio bronquiolar, debido a la invasión por *Mycoplasma hyopneumoniae* en pulmón de cerdo enfermo. b) Epitelio bronquiolar, en pulmón de cerdo sano (Cano, 2008).

El diagnóstico se realiza mediante la historia clínica, examinando los pulmones post mortem e integrando el diagnóstico histopatológico. Pero esto no es prueba de un diagnóstico específico, por eso es necesario confirmarlo con una o más de las siguientes pruebas: Prueba serológica (ELISA), prueba de anticuerpos fluorescentes (FAT's), reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y finalmente el aislamiento bacteriano (Leon et al., 1996).

Dentro de las técnicas de diagnóstico una de las más sensibles es la inmunohistoquímica, la cuál permite demostrar una variedad de antígenos presentes en las células o tejidos utilizando anticuerpos marcados. Esta técnica tiene su fundamento en la identificación de un antígeno determinado por medio de un anticuerpo específico, al igual que en otras pruebas de tipo inmunológico, pero con la ventaja de que los antígenos pueden ser observados "*in situ*", en cortes de tejido u otro preparados como extendidos o improntas celulares, permitiendo estudiar las características morfológicas, la localización de compuestos tisulares y celulares en procesos o condiciones normales o patológicas (como la producción de isoenzimas, marcadores tumorales), o identificar otro tipo de compuestos y partículas tales como virus, bacterias, anticuerpos, etc. en dichas estructuras. Esta reacción es visible sólo si el anticuerpo está marcado con una sustancia que absorbe ó emite luz ó produce coloración. Las técnicas inmunohistoquímicas enzimáticas permite una localización más precisa de las reacciones, ya que la tinción es permanente, estable, puede contrastarse y puede ser evaluada con microscopio óptico (Hans y Klaus, 2001).

Las pruebas de IF fueron las primeras en ser desarrolladas y se caracterizan por el uso de compuestos fluorescentes o fluorocromos conjugados a los anticuerpos que, indirecta o directamente quedan unidos al antígeno y son observados con un microscopio de luz ultravioleta. El isotiocinato de fluoresceína es el fluorocromo más utilizado y el que puede ser observado haciendo incidir sobre la preparación luz entre 450 y 490 nm de λ y con un filtro amarillo puede observarse de color

amarillo-verde sobre las preparaciones; éstas no permiten ser conservadas por tiempos prolongados (hasta una semana), debido a que los cromógenos al contacto con la energía luminosa se pierden, o al paso de los días, se deteriora o pierde la fluorescencia del compuesto (Masseyeff, 1993).

La técnica de inmunoperoxidasa utiliza como marcador a la enzima peroxidasa (extraída del rábano picante), enzima capaz de hacer cambiar de color un cromógeno incoloro. El uso de enzimas, en este caso la peroxidasa, ha implicado la variedad de tinciones debido a que se pueden ocupar varios sistemas sustrato-cromógeno según las necesidades de cada caso. Por ejemplo, los sustratos más utilizadas son enzimas; los cromógenos son diaminobencidina (color pardo), aminoetilcarbazol (color rojo) y nitroazul de tetrazolio (color azul). Estos marcadores pueden unirse (conjugarse) directamente al anticuerpo primario o bien indirectamente mediante otros anticuerpos (secundarios) o sustancias como biotina o proteína A. En general los sistemas mas utilizados son aquellos que como producto final forman un precipitado insoluble, en solventes orgánicos, sobre el sitio donde se encuentra la peroxidasa (y por consiguiente, el antígeno en estudio) permitiendo contrateñir y fijar con resina las preparaciones. Entre estos sistemas se encuentra el de H_2O_2 - diaminobencidina (donde la enzima reduce el peróxido de hidrógeno y posteriormente se oxida la diaminobencidina), cuyo producto final es un precipitado color café-marrón (Hans y Klaus, 2001).

El fundamento de la prueba de inmunoperoxidasa se basa en dos reacciones principales que tiene como base un corte histológico o impronta donde se encuentre el antígeno a ser estudiado: 1) la identificación de un antígeno con un anticuerpo primario conjugado a la enzima, específico al antígeno, posterior a una incubación adecuada; 2) la aplicación e incubación con la solución sustrato-cromógeno más adecuada a los propósitos finales (Henry, 2000).

2.4 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.

El procesamiento de las muestras es una de los pasos más importantes, debido a que sino se llevan adecuadamente, pueden lesionar el tejido u órgano, destruir al agente patógeno a estudiar y por consiguiente, arrojar datos no deseados para la prueba a realizar. Los pasos a seguir son los siguientes:

I. FIJACIÓN DEL TEJIDO

Este proceso se refiere al tratamiento del tejido con sustancias químicas que tienen varias finalidades:

- a) Conservar los tejidos de forma que muestren el mayor parecido posible a su estado *in vivo*.
- b) Aumentar la dureza del tejido para facilitar la preparación de finas películas de éste.
- c) Interrumpir los procesos celulares dinámicos que ocurren a la muerte de la célula (Ross, 1992).

Esto se logra al inactivar ciertas enzimas celulares que de otra manera iniciarían la autólisis y llevarían a la degeneración post mortem (Ross, 1992).

La fijación mantiene las estructuras al estimular la formación de enlaces cruzados entre las proteínas.

Los agentes más usados para microscopía de luz son:

formaldehído al 4%, formol amortiguado o formalina al 10% (solución de formaldehído especial) (Ross, 1992).

II. DESHIDRATACIÓN

Después que la muestra ha sido fijada se elimina el fijador y se deshidrata.

Debido a que una gran parte del tejido está constituido por agua, se aplica una serie gradual de soluciones acuosas de menor a mayor de agente deshidratante, por ejemplo, alcohol etílico o acetona. Iniciando con alcohol al 50 %, luego con una solución de 60%, 70%, 80%, 90%, 96% y alcanzando de manera paulatina el alcohol al 100 % para eliminar el agua. Esto se hace por que si se colocara el tejido en una solución al 100% de alcohol inmediatamente, el agua saldría muy rápido del tejido y se deformaría (Ross, 1992).

III. ACLARAMIENTO O DIAFANIZACIÓN

Luego de deshidratar el tejido, se pasa a una solución de una sustancia que es miscible tanto con el alcohol como con el medio de inclusión a utilizar (en la mayoría de los casos se utiliza como medio de inclusión parafina líquida). La sustancia comúnmente utilizada es el xileno o xilol. De la misma manera se coloca la muestra de tejido en un recipiente de xilol, el xilol solo es soluble en alcohol al 100%. Se llama aclaramiento ya que el tejido se torna transparente o claro en el xileno, esto se debe a que cambia su índice de refracción. También se pueden utilizar tolueno, benzol o cloroformo como medios de aclaramiento (Ross 1992).

IV. INCLUSIÓN EN PARAFINA

Por lo general, los tejidos son estructuras blandas y frágiles, incluso después de la fijación. De tal forma que previo a la obtención de los cortes, es necesario incluirlos en un medio de soporte. Los medios más utilizados son las ceras o resinas. En estado líquido, estos medios tienen la capacidad de penetrar y rodear el tejido, de esta forma se puede producir el endurecimiento (por enfriamiento o

por polimerización), para formar un bloque sólido que pueda ser cortado fácilmente en el microtomo (Gartner, 2001).

El objetivo de la inclusión es hacer facilitar la sección del tejido a cortes lo suficientemente delgados como para permitir el paso de la luz y ser examinados mediante el microscopio. La mayor parte de los preparados para microscopia óptica tienen un grosor entre 3 a 10 micrómetros (Gartner, 2001).

➤ Inclusión definitiva o formación del bloque.

Los moldes utilizados para este fin son de muchos tipos, de acuerdo a lo que tengamos en el laboratorio y el tipo de adaptador que tengamos para cortar en el microtomo (Gartner , 2001).

a) Moldes de hierro para inclusión de Leuckhart. Consiste en dos piezas en forma de L, de bronce pesado o un material semejante, los dos lados en forma de L se unen y pueden dar bloques regulares con lados paralelos; son ajustables, proporcionando gran variedad de tamaño de bloques (Gartner, 2001).

3. JUSTIFICACIÓN.

En los últimos años se ha presentado una problemática en el diagnóstico de la Neumonía Enzoótica Porcina, debido a que los métodos tradicionales como el aislamiento y las pruebas bioquímicas no cuentan con el 100% de confiabilidad o tardan mucho en realizarse, por lo cual se han buscado nuevas técnicas como son las de orden inmunológico que detectan anticuerpos contra el *Mycoplasma* o por el contrario, demuestran la presencia de la bacteria en el tejido pulmonar por medio de pruebas inmunohistoquímicas, como es la de inmunoperoxidasa directa en tejido pulmonar fijado en paraformaldehído, que se podría considerar para realizar el diagnóstico de dicha enfermedad gracias a las siguientes ventajas:

- La alta especificidad que proporciona.
- No se altera la lectura al paso del tiempo.
- El poco tiempo que implica su realización.
- Su bajo costo al no requerir un microscopio de luz ultravioleta.
- Se requiere de un microscopio óptico convencional para su interpretación.

4. HIPÓTESIS.

Si en la prueba de inmunoperoxidasa directa se detecta la presencia de *Mycoplasma hyopneumoniae*, entonces podremos considerar esta técnica implementada como una alternativa útil para el diagnóstico de la Neumonía Enzoótica Porcina.

5. OBJETIVOS.

Objetivo general:

Detectar la presencia de *Mycoplasma hyopneumoniae* en tejido pulmonar de cerdo enfermo fijado en paraformaldehído por medio de la técnica de inmunoperoxidasa directa.

Objetivos particulares:

- a) Implementar y estandarizar la prueba de inmunoperoxidasa directa sobre cortes histopatológicos de tejido pulmonar porcino infectado.
- b) Evaluar mediante análisis estadísticos los resultados obtenidos de la prueba de inmunoperoxidasa directa.
- c) Comparar los resultados obtenidos con una prueba de inmunofluorescencia directa realizada anteriormente.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MATERIAL BIOLÓGICO

- a) Se recolectaron pulmones de cerdos enfermos procedentes de diferentes granjas del estado de México, de los cuales se seleccionaron 25 órganos que presentaban lesiones sugestivas de *M. hyopneumoniae*, cabe señalar que estas muestras fueron procesados previamente para realizar la prueba de IFD y aislamiento (Flores y Luna, 2008).
- b) Como control pulmonar negativo se eligió un pulmón de cerdo de aproximadamente tres meses de edad, que provenía de una granja libre de enfermedades respiratorias, sin lesiones macroscópicas de ninguna índole, del que no se aisló microorganismo alguno.
- c) Controles pulmonares positivos; se eligieron dos pulmones infectados con el *Mycoplasma*, uno fue de campo y el otro provino de un cerdo inoculado con la cepa 194 de *M.hyopneumoniae*.
- d) Anticuerpo policlonal producto comercial (anti-cerdo Ig G conjugado con peroxidasa, No. A – 7042 laboratorios Sigma inmuoquímicos).

6.2 MATERIAL NO BIOLÓGICO

- a) Paraformaldehido al 4 %
- b) Frascos ámbar con rosca de 100 ml
- c) Cubreobjetos
- d) Portaobjetos
- e) Gradilla para portaobjetos
- f) Tren de alcoholes (concentración de 70, 80, 97, 98, 100, Xileno)
- g) Tubos eppendorf
- h) Varillas para cajas petri
- i) Cajas petri
- j) Pipetas graduadas 10 ml

- k) Recuperador antigénico (Target-Retrival Sol Dako IVD, S 236)
- l) Solución buffer fosfatada (PBS)
- m) Tween 20 % (Sigma P 1379- 25ml)
- n) Caja de plástico 10 cm x 20 cm (caja húmeda)
- o) Papel reciclado (cama húmeda)
- p) Tabletas de diaminobencidina (Sigma fast 3,3 – diaminobenzidine tablets D 4168)
- q) Agua destilada
- r) Agua oxigenada al 30%
- s) Metanol
- t) Hematoxilina
- u) Microscopio óptico
- v) Cámara digital
- w) Vortex

6.3 RESCATE ANTIGÉNICO (Procedimiento para la limpieza de epitopos, enmascarados por el proceso de inclusión en parafina).

- a) Desparafinar (Quitar la parafina del tejido pasando el portaobjetos a través de un tren de alcoholes de mayor a menor concentración).
- b) Hidratar con agua destilada por 10 min.
- c) Incubar con PBS por 10 min.
- d) Sacar y colocar los cortes en una caja de petri con varilla.
- e) Agregar gotas de PBS más detergente tween al 50 % por 15 min.
- f) Quitar PBS más detergente.
- g) Agregar el recuperador antigénico por 15 min.
- h) Lavar con PBS (Coraminas , 2008).

6.4 TÉCNICA DE INMUNOPEROXIDASA DIRECTA.

- a) Se lavó el tejido pulmonar 2 veces con PBS isotónica ($\text{KH}_2\text{PO}_4 - 12\text{H}_2\text{O}/\text{KH}_2\text{PO}$) (5min c/u).
- b) Se bloqueó la peroxidasa endógena del tejido pulmonar con solución de metanol/ H_2O_2 al 5% por 30 min.
- c) Se lavó 3 veces la laminilla con PBS con un pH 7.2, 1 M (5 min c/u).
- d) Se puso primer anticuerpo (Ac) policlonal peroxidado a la laminilla e incubó en cámara húmeda por 2 horas a temperatura ambiente promedio de 22° C.
- e) Se lavó 3 veces con PBS(5min c/u).
- f) Se puso la solución de revelado de 3-4 Mg 3,3 –diamino benzidina (DAB) y se incubó de 1 min a 10 min., de acuerdo a la intensidad de color marrón deseado, transcurrido este tiempo, se enjuagaron las laminillas con agua destilada para detener la reacción de la DAB.
- g) Contrastar con hematoxilina, 5 seg.
- h) Deshidratar (eliminar el agua del tejido pasando el portaobjetos a través de un tren de alcoholes de menor a mayor concentración).
- i) Se monto en resina.
- j) Se observaron las laminillas en el microscopio óptico (Masseyeff y Albert , 1993).

6.5 TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA.

La resultados obtenidos de la inmunofluorescencia directa fueron obtenidos del trabajo previo realizado por Flores y Luna (2008).

6.6 EVALUACIÓN DE LAS PRUEBAS.

La especificidad y sensibilidad de la prueba de Inmunoperoxidasa Directa y la de Inmunofluorescencia Directa, se realizó a partir de una tabla 2 x 2, ver tabla 1 (Dawson-Saunders, 1993).

Tabla 1. Sensibilidad y Especificidad.

	No. de muestras positivas	No. de muestras negativas
No. de individuos con enfermedad	A	B
No. de individuos sin enfermedad	C	D

Donde:

- A = número de individuos enfermos clasificados correctamente por la prueba o verdaderos enfermos.
- B = número de individuos enfermos mal clasificados por la prueba o falsos sanos.
- C = número de individuos sin la enfermedad mal clasificados por la enfermedad o falsos enfermos
- D = número de individuos sin la enfermedad correctamente clasificados por la prueba o verdaderos sanos (Dawson-Saunders 1993).

Sensibilidad : $(A/A+B) * 100$

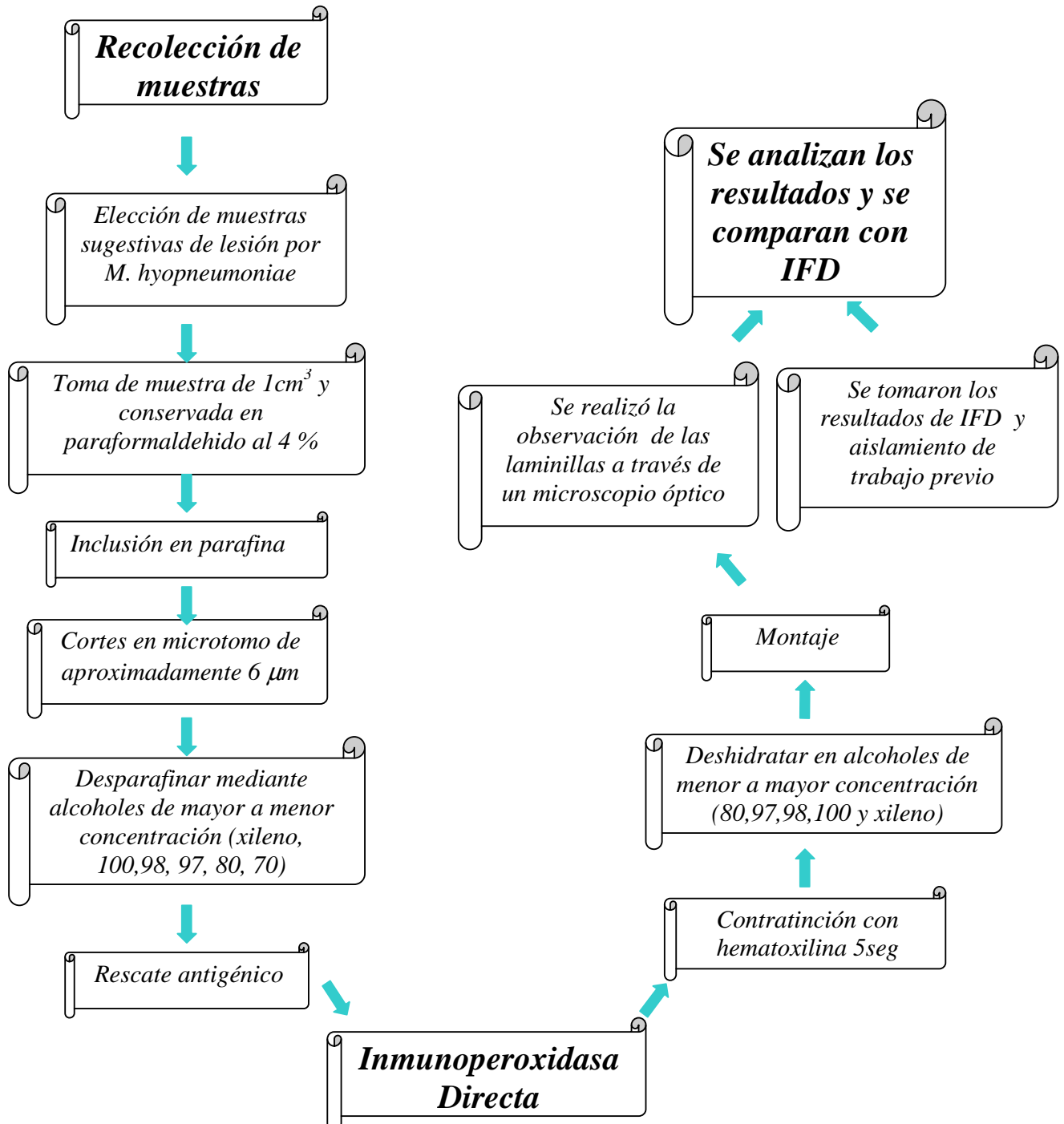
Especificidad : $(D/C+D) * 100$

Valor predictivo positivo: $(A/A+C) * 100$

Valor predictivo negativo: $(D/B+D) * 100$

Eficacia de la prueba: $(A+D) / (A+B+C+D) * 100$ (Dawson-Saunders, 1993).

7. DIAGRAMA DE FLUJO DEL EXPERIMENTO REALIZADO.



(Cano, 2008)

8. RESULTADOS.

Los resultados de las pruebas de inmunoperoxidasa directa (IPD) e inmunofluorescencia directa (IFD), así como los resultados del cultivo bacteriano de las 25 muestras se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Resultados de las pruebas de IPD, IFD y Cultivo.

No. de Muestra	Resultado Prueba Inmunoperoxidasa Directa	Resultado Prueba Inmunofluorescencia Directa *	Resultado de cultivo*
1.	Positivo	Positivo	Negativa
2.	Positivo	Positivo	Negativa
3.	Positivo	Positivo	Negativa
4.	Positivo	Negativo	Negativa
5.	Positivo	Negativo	Negativa
6.	Positivo	Negativo	Negativa
7.	Negativo	Negativo	Negativa
8.	Positivo	Negativo	Negativa
9.	Positivo	Positivo	Positiva
10.	Positivo	Positivo	Positiva
11.	Positivo	Negativo	Negativa
12.	Positivo	Negativo	Negativa
13.	Negativo	Negativo	Negativa
14.	Negativo	Negativo	Negativa
15.	Positivo	Negativo	Negativa
16.	Positivo	Positivo	Negativa
17.	Positivo	Positivo	Negativa
18.	Negativo	Positivo	Positiva
19.	Positivo	Positivo	Positiva
20.	Negativo	Positivo	Positiva
21.	Positivo	Positivo	Positiva
22.	Positivo	Positivo	Positiva
23.	Positivo	Positivo	Positiva
24.	Positivo	Negativo	Negativa
25.	Negativo	Positivo	Positiva

Datos tomados de la tesis "Diagnostico de neumonia enzootica en granjas del Edo. de Mex. mediante las técnicas de planimetría, análisis digitalizado de imagen, inmunofluorescencia y aislamiento e identificación de *Mycoplasma hyopneumoniae*". Flores Anaya y Luna Téllez., 2008

La comparación de los resultados obtenidos entre la IPD e IFD, se muestran en la tabla 3, donde se observa un mayor porcentaje de positividad de la prueba de IPD sobre la IFD.

Tabla 3. Resumen de los resultados de las 25 muestras problemas

Pruebas	Número de muestras			Porcentaje		
	Muestras positivas	Muestras negativas	Total de muestras	% positivo	% negativo	Total
Inmunoperoxidasa directa	19	6	25	76 %	24 %	100 %
Inmunofluorescencia directa	14	11	25	56 %	44 %	100 %

La reacción positiva a la IFD se muestra en la figura 3, en tejido pulmonar de cerdo infectado, mientras que la reacción negativa se muestra en la figura 4, en tejido pulmonar cerdo sano.

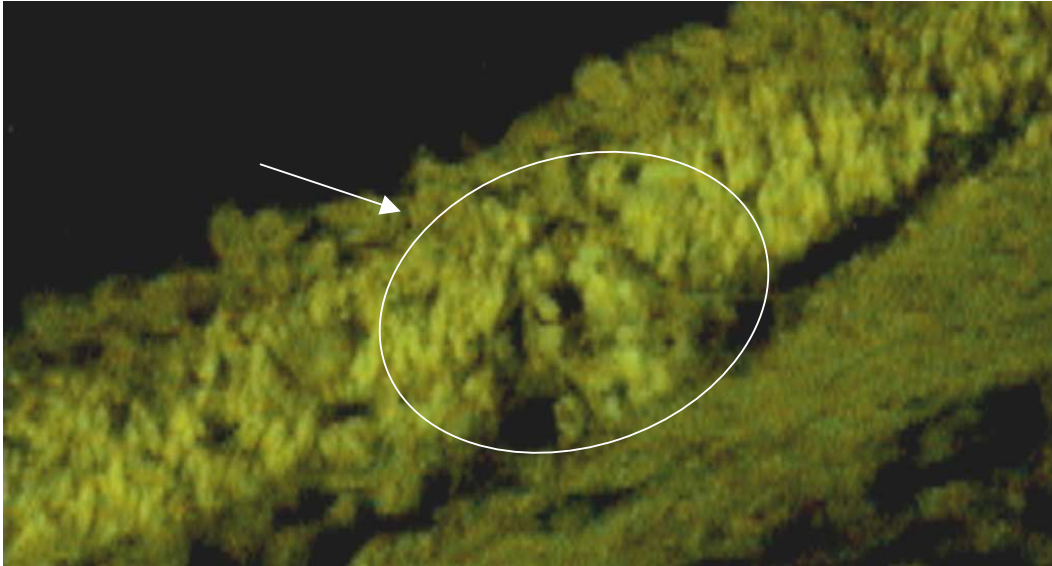


Fig. 3 Muestra de tejido pulmonar de cerdo infectado con *Mycoplasma hyopneumoniae* dando reacción positiva a la prueba de IFD. Nótese la coloración verde-limón sobre el epitelio bronquiolar (Flores y Luna, 2008).

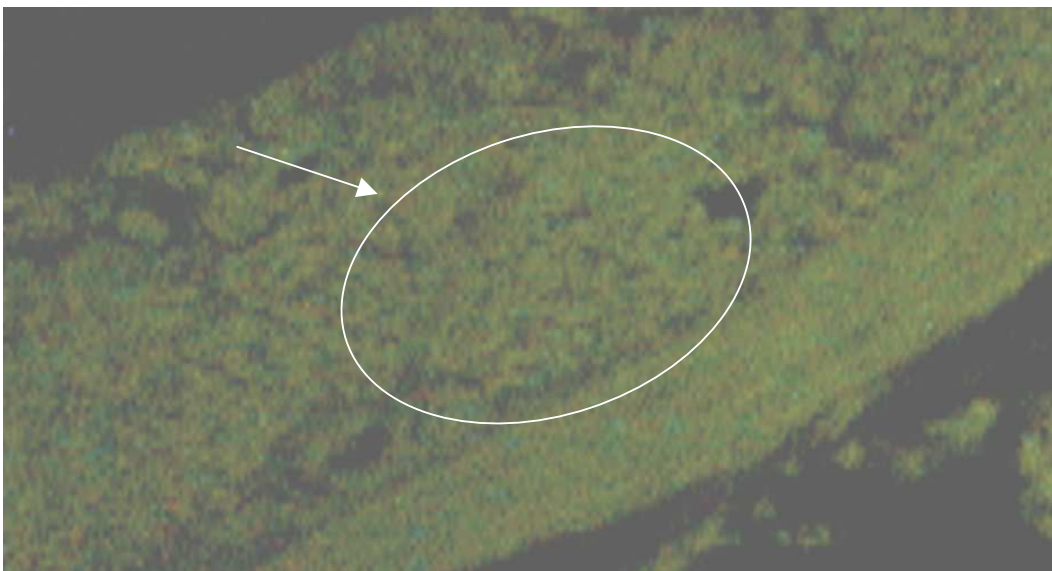


Fig. 4 Muestra de tejido pulmonar de cerdo sano dando reacción negativa a la prueba de IFD. Nótese la ausencia de la coloración verde-limón sobre el epitelio bronquiolar (Flores y Luna, 2008).

La reacción positiva a la IPD se muestra en la figura 5, en tejido pulmonar de cerdo infectado, mientras que la reacción negativa se muestra en la figura 6, en tejido pulmonar de cerdo sano.

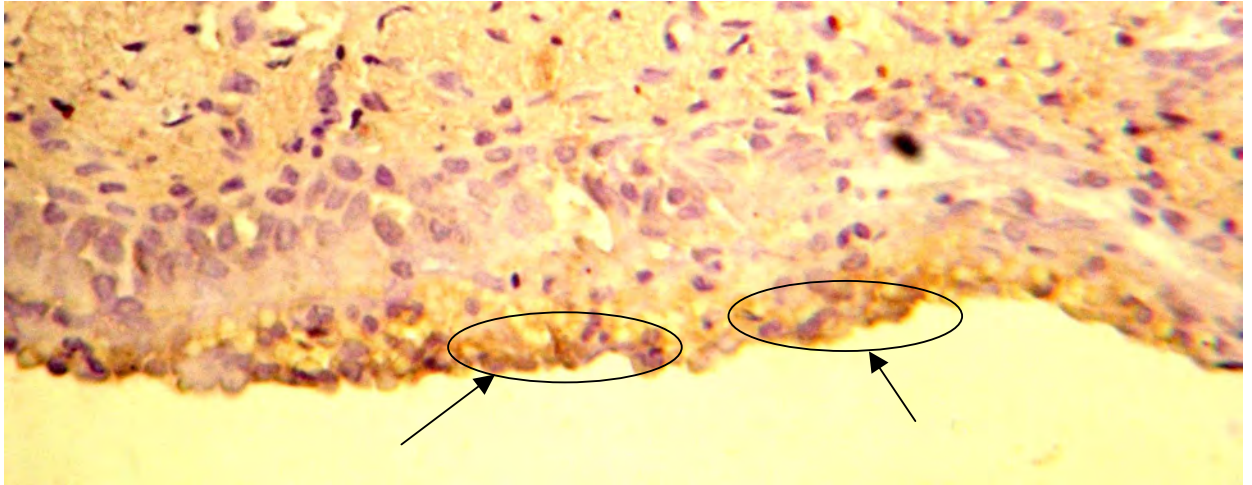


Fig. 5 Muestra de tejido pulmonar de cerdo infectado con *Mycoplasma hyopneumoniae* dando reacción positiva a la prueba de IPD. Nótese la coloración café-marrón sobre el epitelio bronquiolar (Cano, 2008).

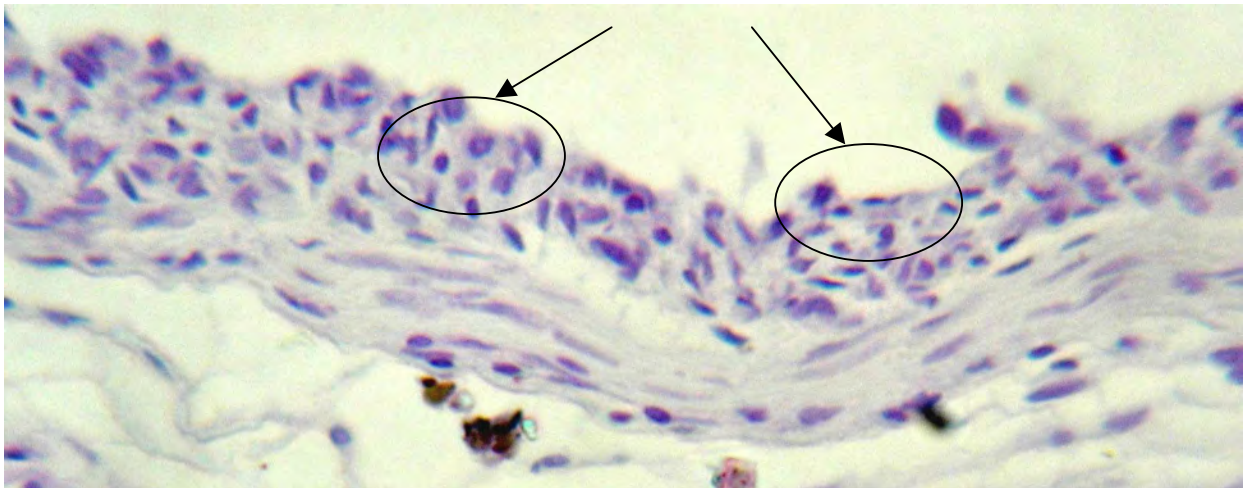


Fig. 6 Muestra de tejido pulmonar de cerdo sano dando reacción negativa a la prueba de IPD (Cano, 2008).

Procedimiento para la obtención de resultados en la tabla 2 x 2 para la prueba de inmunoperoxidasa directa, ver tabla 4.

Tabla 4. Resultados de sensibilidad y especificidad de la prueba de inmunoperoxidasa directa.

		Prueba	
		No. de muestras positivas	No. de muestras negativas
Enfermedad	No. de individuos con enfermedad	6	3
	No. de individuos sin enfermedad	13	3

Sensibilidad : $(6 / 9) * 100 = 66.66 \%$
 Especificidad : $(3 / 16) * 100 = 18.75 \%$
 Valor predictivo positivo : $(6 / 19) * 100 = 31.57 \%$
 Valor predictivo negativo : $(3 / 6) * 100 = 50 \%$
 Eficacia de la prueba : $(9 / 25) * 100 = 36 \%$

Procedimiento para la obtención de resultados en la tabla 2 x 2 para la prueba de inmunofluorescencia directa, ver tabla 5.

Tabla 5. Resultados de sensibilidad y especificidad de la prueba de inmunofluorescencia directa.

		Prueba	
		No. de muestras positivas	No. de muestras negativas
Enfermedad	No. de individuos con enfermedad	9	0
	No. de individuos sin enfermedad	5	11

Sensibilidad : $(9 / 9) * 100 = 100 \%$
 Especificidad : $(11 / 16) * 100 = 36.36 \%$
 Valor predictivo positivo : $(9 / 14) * 100 = 58.82 \%$
 Valor predictivo negativo : $(11 / 11) * 100 = 50 \%$
 Eficacia de la prueba : $(20 / 25) * 100 = 56 \%$

9. DISCUSIÓN

En el país, el diagnóstico de la Neumonía Enzootica Porcina es muy escaso, el aislamiento se utiliza como prueba confirmatoria. Existe la prueba de inmunofluorescencia, pero tiene la desventaja que es costosa, principalmente por el uso de un microscopio de luz ultravioleta, además de que no muestra estructuras claras del tejido pulmonar, solo la marca de los fluorocromos. Para eso se han desarrollado técnicas inmunohistoquímicas menos costosas y sencillas; con la finalidad de dar una opción a los laboratorios especializados para emitir un diagnóstico rápido y efectivo de este padecimiento, de esta forma se apoyará a los médicos veterinarios encargados de las granjas porcinas a detectar la enfermedad a tiempo.

En este trabajo se trató de estandarizar la prueba de inmunoperoxidasa directa para su posterior utilización en el diagnóstico de este padecimiento.

Al ser comparados los resultados de la inmunoperoxidasa directa con la inmunofluorescencia directa, por medio de la tabla 2 x 2, se observó que es de mayor efectividad la IFD. Demostrando una sensibilidad del **100 %**, una especificidad del **36.36 %** y una eficacia del **56 %**, en comparación con la Inmunoperoxidasa Directa con una sensibilidad del **66.66 %**, una especificidad del **18.75 %** y una eficacia del **36%**. Dando un 20 % más de efectividad la prueba de inmunofluorescencia directa.

En otros estudios que utilizaron la prueba de inmunoperoxidasa, León (2001), menciona que obtuvo una sensibilidad de **97.56%**, una especificidad de **80.00%** y una eficacia de un **92.85%**, y Gutiérrez (2001), indica los siguientes resultados, una sensibilidad del **100%** y una especificidad del **92.68 %** para la prueba de inmunoperoxidasa directa.

Esto nos muestra que la discrepancia en los resultados obtenidos en este trabajo, pudo atribuirse a que, las muestras fueron conservadas en paraformaldehído e incluidas en parafina, además del congelamiento y descongelamiento que sufrieron los órganos en varias ocasiones. Esto pudo ocasionar un daño del tejido y, por consiguiente destruir al agente patógeno provocando la inhibición del crecimiento en el medio de Friss. Realizando esta metodología se observó lo siguiente:

- a) Se requiere pasos de recuperación antigénica, por lo que aumenta el costo.
- b) La estructura histológica se conserva.
- c) Se requiere adiestramiento visual para detectar falsos positivos.
- d) Se obtiene una especificidad y sensibilidad baja.

León y Gutiérrez trabajaron con muestras congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ embebidas en un crioprotector (tissue tek). En este caso, no hay una manipulación tan agresiva hacia el órgano, lo cual, proporciona un menor daño del tejido y un ambiente estable para que el *Mycoplasma* permanezca vivo.

Con los resultados obtenidos, una de las ventajas de la inmunoperoxidasa directa e inmunofluorescencia directa es que puede suplir el problema de un aislamiento bacteriano negativo, esto quiere decir, que a pesar de que la bacteria este muerta, pueden detectarse residuos de la misma en las células, aunque haya sido eliminada la infección. Además de que se puede complementar el diagnóstico con lesiones presentes en el tejido pulmonar.

Gracias a las técnicas inmunohistoquímicas (inmunoperoxidasa directa e inmunofluorescencia directa) y en conjunto con el cultivo, podemos llegar a un diagnóstico eficaz y concreto. Porque además de que hay una marca del anticuerpo unido a la bacteria ó partículas de esta, también se puede observar lesiones en el tejido pulmonar como destrucción de cilios ó presencia de células de defensa (macrófagos, polimorfonucleares, linfocitos).

10. CONCLUSIONES

Los resultados de la prueba de inmunoperoxidasa directa con una sensibilidad del **66.66 %**, una especificidad del **18.75 %** y una eficacia del **36%**, resultaron ser inferiores a un estudio paralelo que utilizó inmunofluorescencia directa.

Por lo anterior y debido a una baja sensibilidad, especificidad, eficacia y a la presencia de falsos positivos, no se recomienda la IPD con la metodología indicada en este trabajo como una técnica para la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae*, en pulmón de cerdo enfermo.

Para complementar la técnica de inmunoperoxidasa directa y mejorar los resultados se recomienda:

- a) Trabajar con muestras congeladas recientes, evitar el descongelar y congelar en repetidas veces para no alterar el tejido y conservar al agente patógeno.
- b) Utilizar un crioprotector (tissue tek) o en su caso, un conservador (formalina al 10 %), que no sea tan agresivo para el tejido pulmonar.
- c) Personal experimentado para la interpretación de la lectura entrenada en inmunohistoquímica.

11. BIBLIOGRAFÍA.

- ¹ Blood, D.C. Radostis, O.M.. *Medicina Veterinaria*, 7^a ed., Interamericana Mc Graw-Hill, 1992 Madrid, España, p.p. 843- 848
- ² Cruz Sánchez T. A., Ciprian A., *Manual de laboratorio para el diagnostico de neumonía enzootica*. ed. 2004. p.p 46-47.
- ³ Dawson-Saunders, B. and Trap, R. *Bioestadística Médica*. ed. El Manual Moderno. México, (1993). p.p 172-177
- ⁴ Dwigl C. Hirst, N. James MacLean, *Veterinary Microbiology*, 2 edition. ed. Blackwell. 2004. p.p. 240-242
- ⁵ Gartner. *Histología, texto y atlas*. ed. McGraw Hill. México. 2001, pp. 1-3
- ⁶ Hans Plonait, Klaus Bickhardt, *Manual de las enfermedades del cerdo*, Acribia S.A. Zaragoza, 2001. p.p 140- 146.
- ⁷ Henry, J. B.. *Diagnóstico y tratamiento clínico para el laboratorio*. 9^a ed. Salvat. México, 2000
p.p 54-58
- ⁸ Lara, P., Cruz, S., Mendoza, E., Colmenares, U. y Ciprian, C. *Evaluación de un conjugado de Inmunofluorescencia, desarrollado en la FES-Cuautitlán, para el diagnostico de la Neumonía Enzootica*. X Congreso Nacional de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos. Manzanillo, Colima. México, (1995). p.p 54-55.
- ⁹ Leon SC., Cruz ST, Ciprian C.A., *Detección de Mycoplasma hyopneumoniae en tejido pulmonar de cerdos por la prueba de inmunoperoxidasa indirecta*, Reunión Nacional de Investigación Pecuaria Morelos 96, Cuernavaca Morelos, México 1996.
- ¹⁰ *Manual of diagnostics tests and vaccines for terrestrial animal*. Vol I. 5 ed. World organization for animal health. 2004, p.p 574-575.
- ¹¹ Masseyeff, R. F., Albert, W. H. and staines, N.A. *Methods of Immunological analysis*. Vol 3 Cells and Tissues. Rep. Fed. of Germany, (1993). p.p 148-341.
- ¹² Morilla G.A., *Manual para el control de las enfermedades infecciosas del cerdo*, Manual moderno, 2 ed. 2005. p.p. 231-343
- ¹³ Rodríguez Roger, *Enfermedades de importancia económico en producción animal*, McGraw Hill, 2003. p.p 453
- ¹⁴ Ross, Michael. *Histología, texto y atlas color*. ed. Panamericana. 2^a Edición. 1992, pp. 40-49

¹⁵ Straw Barbara E., Zimmerman Jeffery J, *Diseases of swine*, Blackwell 9st. ed, 2002 p.p. 701- 707

TRABAJOS CONSULTADOS

¹⁶ Flores A. Liliana, Luna T. Gabriela “*Diagnóstico de Neumonía enzootica en granjas del estado de México mediante las técnicas de planimetría, análisis digitalizado de imagen, inmunofluorescencia e identificación de Mycoplasma hyopneumoniae*”, Tesis de licenciatura, UNAM. México 2008.

¹⁷ Gutiérrez B. Berenice R. “*Correlación entre las pruebas de Inmunofluorescencia Directa e Inmunoperoxidasa Directa para la detección de Mycoplasma hyopneumoniae*”, Tesis de licenciatura UNAM, México 2001

¹⁸ León S. Claudia, “*Desarrollo de una prueba de Inmunoperoxidasa Indirecta para identificar Mycoplasma hyopneumoniae en tejido pulmonar porcino*”, Tesis de licenciatura. UNAM, México. 2001

CONSULTAS DE INTERNET:

¹⁹ Calsamiglia M. *Mycoplasma hyopneumoniae: epidemiología y control*
Fuente: http://www.colvet.es/Infovet/jun01/ciencias_v/articulo1.htm 1 / 03 /2008

²⁰ Coraminas J.M., Técnicas de inmunohistoquímica
fuente: <http://www.conganat.org/seap/revista/v30-n1/14.pdf> 2 / 03 /2008

²¹ Huerta Lorenzo Belén, Perea Anselmo Remujo, *Neumonía enzoótica porcina: aspectos epidemiológicos*
Fuente : <http://www.avancesentecnologiaporcina.com/contenidos/neumar6>. 1 / 03 /2008

²² Dra. Lobo Evelyn, *Mycoplasma hyopneumoniae y su relación con los procesos respiratorios del cerdo.*
Fuente: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101005.html> 1 / 03 /2008

²³ Retamal, Patricio Dr. *Epidemiología de las enfermedades respiratorias del cerdo*
TecnoVet, Año 7 N°3, diciembre 2001
Fuente: <http://www.tecnovet.uchile.cl> 1 / 03 /2008