

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**Facultad de Estudios Superiores
Cuautitlán**

**“DIAGNÓSTICO DE NEUMONÍA ENZÓOTICA EN GRANJAS DE
MÉXICO MEDIANTE LAS TÉCNICAS DE PLANIMETRÍA, A
DIGITALIZADO DE IMAGEN, INMUNOFLUORESCENCIA,
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Mycoplasma hyopneumoniae*”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A N:

LILIANA FLORES ANAYA

GABRIELA LUNA TÉLLEZ

ASESOR: DR. TONATIUH ALEJANDRO CRUZ SÁNCHEZ.

COASESORES: M.V.Z. MARÍA DEL CONSUELO ÁLVAREZ RODRÍGUEZ

M en C. GERMÁN ISAURO GARRIDO FARIÑA

M.V.Z. MARCO ANTONIO MENDOZA SAAVEDRA.



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.

- ESTE TRABAJO FUE APOYADO POR EL I
PAPIIT IN 209-701 ANÁLISIS DE LAS POB
CELULARES DEL APARATO RESPIRATORIO
INFECCIÓN DE MICOPLASMA Y LA CÁT
INVESTIGACIÓN FESC-IN2-34
- POR LA CATEDRA DE INVESTIGACION
DESARROLLO, ADAPTACIÓN E INVESTIG
MICROTECNIA APLICADA A MICROSCOPIA F

Agradecimientos

A ti papá que desde niña me enseñaste que nada te regalan, que todo cuesta y que en esta vida nada es fácil, de ti he aprendido que nos debemos esforzar no importando lo cansado que estés o lo decepcionante que resulte tu día. Desde que tengo noción de lo que pasa a mi alrededor me pude dar cuenta como te has esforzado y lo mucho que has trabajado para que nada nos falte aunque esto implique poner en riesgo tu salud o el sacrificar tiempo de descanso para que a tu familia jamás le falte nada, no sabes cuanto te lo agradezco la mejor herencia que me has podido haber dado es darme una educación y más que eso luchar por un lugar en esta vida te lo agradezco; se que no eres muy expresivo pero se que estas orgulloso de mi y yo del padre que me toco gracias papi.

A ti mamá a ti te debo el mantener todavía un poco de cordura, gracias a dios siempre te he tenido a mi lado, en la enfermedad, cuando estoy triste y sobre todo aconsejarme en todas las veces que me he equivocado, no sabes cuanto agradezco el llegar a mi casa cansada y aburrida del transporte y poderme sentar a lado tuyo y platicar de mi día y tu del tuyo, siempre me has impulsado a seguir adelante de tener la ambición de tener una profesión y poder valerme por mi misma, no me bastaría todas hojas disponibles de esta tesis para agradecerte el que me hayas tenido paciencia en mis berrinches y hasta en mis groserías, te admiro mamá tienes una gran fortaleza. Gracias por ser mi mamá.

A mi hermana Gaby lo que te puedo decir es gracias por hacerme compañía contigo a mi lado me es imposible sentirme sola tu le pones alegría y vida a nuestras vidas, escucha el consejo que te puede dar tu hermana mayor; no te rindas aquí tienes un ejemplo de cuanto trabajo me ha costado esto, pero al final del camino te das cuenta que valió la pena todo lo que pase para llegar a este punto la satisfacción que se siento es indescriptible, tu puedes hacerlo mejor que yo sólo deséalo.

A ti amor, mi Pablo tu que has estado conmigo desde el inicio de esta aventura, me has dado tantas fuerzas para seguir y sobre todo creíste en mi aún cuando yo misma creía que no iba poder había momentos en los que me quería dar por vencida pero siempre estuviste ahí para darme ánimos y echarme porras, siempre has estado conmigo, no me queda más que agradecerte y decirte lo mucho que te amo, esto lo empezamos juntos y juntos lo terminamos, se acabo un capítulo pero no se ha acabado de escribir este libro aún falta mucho y espero siempre ir de tu mano. Te amo gracias por tenerme tanta paciencia y por esperarme estos años para construir una vida juntos, lo logramos amor por fin llego ese día te amo.

A mis amigos Memo, Elizabeth y por supuesto Gaby, pasamos muchas cosas juntos, compartimos una carrera y una amistad llego el momento en el cuál cada uno tomara un camino distinto, pero espero de verdad que siempre estemos en contacto, aunque estemos lejos, pueden visitarme hacen una hora en avión, les deseo suerte en cualquier cosa en la incursionen.

GRACÍAS LO LOGRAMOS

Liliana

A mis padres:

Gracias a ustedes por brindarme su apoyo en todo momento, por permitirme cumplir uno de mis sueños que es el haber estudiado una carrera tan maravillosa como la Medicina Veterinaria; pero principalmente por darme las armas necesarias para enfrentar la vida laboral y personal.

A mis hermanos

Por ayudarme a alcanzar mis metas, por ayudarme con mis trabajos y tareas e incluso por llevarme a mis practicas, por sus platicas y sobre todo por su apoyo. Aunque a veces no estemos de acuerdo en muchas cosas o haya peleas los quiero muchísimo.

A ti Memo por prestarme tu cámara y por tu apoyo para realizar mis trabajos aunque todavía te deba tu hamburguesa.

A Luisito por enseñarme que no hay abismos en la vida solo obstáculos difíciles pero no imposibles de vencer, gracias por tus ganas de vivir y por demostrar que la discapacidad no es un límite si no una forma diferente de hacer las cosas te amo mi niño.

A mis dos gran amores

A ti cielito por permitirme conocer el lado más bello de la vida, que es ser mamá y esposa, por hacerme sonreír, pero sobre todo por tu apoyo con la escuela y mis trabajos y por estar conmigo.

Gracias por permitirme compartir momentos de felicidad a tu lado y por darme a ese bebé tan lindo y tan latoso que tenemos a nuestro lado.

Y a ti mi bebe por darme esa felicidad tan inmensa con tus sonrisas y juegos los amo mucho.

Y a ti Abuelita por tu apoyo, tus pláticas y por acompañarme siempre en todos los momentos de mi vida

De verdad no encuentro palabras para agradecer todo aquello que han hecho por mi incondicionalmente y doy gracias a dios por darme una familia tan maravillosa como ustedes, que han dado todo hasta donde han podido muchas gracias.

A mis amigos:

Lula, Memo, Lili, Dare, Ely, karlita, Paola, Cristina, Lore, Ari, Mauricio, por su ayuda y por todas aquellas experiencias que compartieron conmigo dentro y fuera de la escuela y que nunca podría olvidar.

GABY

A ti Marco mira que tu has sido el responsable de que estemos aquí, nos divertimos mucho al hacer el servicio social contigo y sobre todo aprendimos y recordamos cosas que creíamos olvidadas, en ese lugar empezó este trabajo, nos tuviste paciencia y sobre todo hicimos amigos muy buenos amigos, gracias por alentarnos y estar al pie del cañón en este trabajo, siempre estuviste para aclarar nuestras dudas y sobre todo estuvo el amigo que aconseja cuando teníamos algún problema personal, fuiste mas que un asesor dando instrucciones para un trabajo. Te convertiste en nuestro amigo

A Chelito gracias por ayudarnos en este trabajo, por darnos tips, y explicarnos con tanta paciencia, hicimos una nueva amiga en este tiempo de tener una estancia en microbiología, vaya que nos aguantaron un buen tiempo, pero ganamos unos muy buenos amigos.

Gracias al doctor Tonatiuh, por ofrecernos este tema de tesis el realizar este trabajo nos enseñó muchas cosas una fue perseverancia, y mucha paciencia no siempre las cosas suceden como queremos ni en el momento que las queremos, sólo suceden cuando deben suceder.

Fueron varias personas las involucradas en este trabajo, no quisiéramos olvidar a ninguna, todas aportaron, nos ayudaron y aconsejaron en la realización de este, entre los que podemos mencionar esta el Doctor Germán Garrido por la facilidades que nos otorgo al utilizar el equipo de histología para la realización de este trabajo, al Doctor Ochoa siempre estuvo presente para despejar algunas de nuestras dudas, al Doctor Mar, queremos agradecer al módulo de equinos que nos apoyo con caballos para la obtención de sangre.

Muchas gracias a todos aquellos maestros que hicieron posible esto y que gracias a sus enseñanzas estemos dando este gran paso

LILI Y GABY

ÍNDICE

	Pág.
1. Resumen.....	2
1.1 Introducción.....	3
1.2 Antecedentes.....	5
1.3 Características generales de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	6
1.4 Transmisión.....	8
1.5 Patogenia.....	9
1.6 Signología.....	11
1.7 Lesiones macroscópicas.....	13
1.8 Lesiones microscópicas.....	13
1.9 Diagnostico.....	14
2. Justificación.....	18
3. Objetivos.....	19
4. Material y Métodos.....	21
5. Resultados.....	34
6. Discusión.....	44
7. Conclusiones.....	46
8. Bibliografía.....	47

1. RESUMEN

En este trabajo se aplicaron las técnicas de Planimetría, Análisis digitalizado de imágenes para determinar porcentaje de lesión neumónica, Inmunofluorescencia, Epifluorescencia y Cultivo para su diagnóstico. Se recolectaron 25 muestras de pulmones de cerdo de diferentes granjas del Estado de México con lesiones sugestivas de Neumonía Enzótica.

Se llevo a cabo la Técnica de planimetría mediante la utilización de diagramas o plantillas de los pulmones donde se marcaron las áreas lesionadas; posteriormente se tomaron fotografías con cámara Samsung (5 mega píxeles) del lado dorsal y ventral de los pulmones para evaluarlas mediante el programa Image Pro Express versión 4 (que es un analizador de imágenes) y determinar el porcentaje de lesión pulmonar con ambas técnicas, paralelamente a esto se tomaron muestras del área lesionada, estas se conservaron en paraformaldeído para ser procesadas mediante la técnica de inclusión en parafina; Para realizar la inmunofluorescencia se realizaron los cortes de los pulmones, se desparafinaron y se procede a realizar la prueba en la cual se utilizó un conjugado comercial y un recuperador antigénico para que los resultados fueran mejores.

Posteriormente se llevo a cabo el aislamiento en el cual se tomo una porción de tejido con lesiones sugestivas a *Mycoplasma hyopneumoniae* se sembró en medio de Friis líquido y sólido; se observo en el microscopio estereoscópico la presencia de colonias sospechosas por lo que se procedió a realizar la Prueba de Epifluorescencia en la cual se corto un trozo de aprox. 1cm² y se le agrego el mismo conjugado que en la prueba de Inmunofluorescencia y se observo en el microscopio de fluorescencia.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes: En la técnica de Planimetría hubo un 42% y en la técnica de análisis digitalizado de imágenes un 32.4% de lesión pulmonar en la que se puede observar una diferencia del 20%, de acuerdo a esto se muestra que la técnica de análisis es la más adecuada para evaluar el porcentaje de lesión pulmonar.

En la prueba de Inmunofluorescencia se encontró que un 56% de positividad a la presencia de Mycoplasma. En el cultivo y aislamiento se obtuvo un 36% esta prueba es mas confiable pero muy tardada y laboriosa; por ultimo en la prueba de Epifluorescencia se obtuvo un 36% de positividad mostrando que es rápida y además se realiza del primo aislamiento.

1.1 Introducción

La mayor incidencia de las patologías respiratorias está ligada al desarrollo de la industria porcina, es así como en las explotaciones no tecnificadas las enfermedades respiratorias se manifiestan de forma esporádica y sin consecuencias económicas apreciables. Sin embargo, en las explotaciones de tipo intensivo ocasionan cuantiosas pérdidas, derivadas de las elevadas tasas de morbilidad y mortalidad en los casos de cuadros agudos, así como de los gastos de tratamientos y de la disminución del índice de conversión de los animales afectados. (Hans p. y Morilla.)

Los principales agentes infecciosos causantes de afecciones respiratorias en cerdos son:

<i>Infecciones Virales</i>	<i>Infecciones Bacterianas</i>	<i>Infecciones parasitarias</i>
Virus PRRS Arterivirus	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	<i>Ascaris suum</i>
Virus Influenza tipo A	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Metastrongylus elongatus</i>
Orthomyxovirus	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Strongyloides ransomi</i>
Coronavirus	<i>Salmonella choleraesuis</i>	<i>Cysticercus tenuicollis</i>
Herpesvirus suis tipo 1	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	<i>Echinococcus hydatidosus</i>

Morilla 2005

Puesto que la importancia del mycoplasma puede sobrevalorarse, se prefiere caracterizarla como una enfermedad infecciosa clásica con determinados signos clínicos típicos y cambios morfológicos. Puede entenderse como, otros padecimientos que tienen en común la moderna explotación animal, la neumonía micoplasmática porcina (NMP) o Neumonía Enzoótica (NE) es una enfermedad de origen multifactorial. (Ciprian A.)

La Neumonía Enzoótica (NE) es la enfermedad pulmonar contagiosa más difundida de los cerdos, es causada por *Mycoplasma hyopneumoniae* que se caracteriza clínicamente por una alta morbilidad y baja mortalidad, se manifiesta como un padecimiento crónico con una producción de tos seca persistente, por lo cuál se presenta una reducción en el desempeño productivo de los animales y en su crecimiento.⁽¹⁵⁾ Con el desarrollo de la producción intensiva de cerdos, los procesos respiratorios han adquirido una gran importancia, constituyendo uno de los principales factores que provocan una pérdida de producción. Además, estos procesos han tenido un incremento en los últimos años a nivel mundial. (Álvarez RM, Bach HP y Peter H.)

La Neumonía Enzoótica es una inflamación pulmonar contagiosa (Bronconeumonía) ocasionada primariamente por un agente filtrable (mycoplasma) y estos se complican por condiciones ambientales adversas y por la acción de gérmenes secundarios. El contagio tiene lugar por el estrecho contacto, el suelo y también que se encuentra en el contenido intestinal, debido a esto provocan en el cerdo enfermedades mortales. Sólo cuando las condiciones de explotación son inadecuadas y la receptividad de los cerdos son altas se desarrolla, por eventual penetración de distintas bacterias en parte acompañadas de pleuritis y pericarditis, que provocan la muerte. Estas bacterias (*Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Archanobacterium pyogenes*, *Haemophilus suis*, *Bordetella bronchiseptica*, etc), se encuentran normalmente en la piel, vías respiratorias y amígdalas de gran parte de los cerdos. Esta es una enfermedad factorial, es decir, que los factores de explotación influyen de manera decisiva sobre el número de animales que resultan infectados y enfermos en una población, la intensidad con que son atacados y el volumen de las bajas y daños económicos. Factores que favorecen a la enfermedad como son, humedad del suelo y paredes, demasiado alta o baja del aire de las naves de los cerdos (más de 90% o menos de 50% de humedad relativa media), deficiente aislamiento del pavimento frío y corrientes de aire, hacinamiento de porquerizas, ventilación insuficiente, elevada concentración de amoníaco, polución, inadecuada desinfección profiláctica, dieta insuficiente, así como otras enfermedades favorecen la enfermedad. (Bach HP, Calsamiglia M, Peter H y Rodríguez S.)

HISTORIA

La enfermedad conocida en Alemania con el nombre de gripe de los lechones está difundida en muchos países, por lo que ocasiona elevadas pérdidas económicas en la cría de cerdos. Este nombre no refleja exactamente el carácter de esta enfermedad crónica, ya que no se limita únicamente a los lechones y tampoco se parece a la gripe. Hasta principios del siglo XX se denominaba pastereiosis crónica del cerdo, fue en los años treinta cuando Köbe (en la isla de Riems) aclaró a detalle la etiología de la enfermedad, a la vez que creó la denominación de gripe de los lechones. (Álvarez M, Ciprian A y Hill R.J.)

Para 1965 fue aislado el micoplasma de un pulmón neumónico, demostrando la existencia de la enfermedad en los Estados Unidos por Maré y Switzer, en Inglaterra por Goodwin y colaboradores. La posibilidad de que un micoplasma estuviera involucrado en la etiología de la Neumonía Enzoótica fue investigada por dos grupos simultáneamente: uno en Iowa, (EU)

y otro en Cambridge (Inglaterra). Ambos reportaron en 1965 un micoplasma que producía neumonía típica en los cerdos, al cuál los americanos llamaron *Mycoplasma hyopneumoniae* y los ingleses *Mycoplasma suisneumoniae*. Posteriormente mediante la prueba de inhibición metabólica, se demostró que eran serológicamente idénticos. El Comité de Nomenclatura de micoplasmas concedió la prioridad al uso de *Mycoplasma hyopneumoniae*. (Álvarez RM y Bach HP.)

1.2 ANTECEDENTES

El *Mycoplasma hyopneumoniae* es el principal agente causante de la neumonía enzoótica en los cerdos, se encuentran asociado a pérdidas en la ganancia de peso, eficiencia alimenticia, retraso en el crecimiento con una alta morbilidad y baja mortalidad. Los cerdos de todas las edades son susceptibles a la enfermedad, pero es más grave en animales de 1 a 4 semanas de vida. (Álvarez, Cruz ST y Morilla)

La neumonía en los cerdos en las etapas de crecimiento y finalización provocan pérdidas económicas considerables en todas las explotaciones porcinas, los problemas respiratorios en los cerdos son una preocupación para la producción porcina la cuál ocupa un lugar muy importante dentro de la producción nacional, ya que esta enfermedad incide gravemente en la productividad de la granja, al momento del sacrificio se ha observado que de un 50 hasta un 90% de los cerdos presentan alguna lesión neumónica. Según Peter H, Ciprián A. y Hill RJ. El impacto en costo por lesiones neumónicas se calcula a través de un minucioso examen en la línea de sacrificio, por lo que se estima, que por cada 1% de pulmón afectado por Neumonía Enzoótica, se reduce el crecimiento 2.2 g /día. (Álvarez RM.)

Debido al carácter crónico, el costo de esta enfermedad para la industria porcina es enorme, ocasionando pérdidas por una deficiente ganancia de peso diario y retraso en el crecimiento. La enfermedad se presenta sobre todo en animales que se crían en condiciones intensivas y se presenta como producto de la interacción entre factores ambientales, de manejo, y todos aquellos inherentes al huésped y al agente etiológico en especial cuando el clima es húmedo y frío, por lo que se ha calculado que si hay 10% de tejido pulmonar afectado, el cerdo sufre retraso de 5% en la ganancia de peso. (Álvarez RM., Cruz ST y Calsamiglia M.)

y otro en Cambridge (Inglaterra). Ambos reportaron en 1965 un micoplasma que producía neumonía típica en los cerdos, al cuál los americanos llamaron *Mycoplasma hyopneumoniae* y los ingleses *Mycoplasma suisneumoniae*. Posteriormente mediante la prueba de inhibición metabólica, se demostró que eran serológicamente idénticos. El Comité de Nomenclatura de micoplasmas concedió la prioridad al uso de *Mycoplasma hyopneumoniae*. (Álvarez RM y Bach HP.)

1.2 ANTECEDENTES

El *Mycoplasma hyopneumoniae* es el principal agente causante de la neumonía enzoótica en los cerdos, se encuentran asociado a pérdidas en la ganancia de peso, eficiencia alimenticia, retraso en el crecimiento con una alta morbilidad y baja mortalidad. Los cerdos de todas las edades son susceptibles a la enfermedad, pero es más grave en animales de 1 a 4 semanas de vida. (Álvarez, Cruz ST y Morilla)

La neumonía en los cerdos en las etapas de crecimiento y finalización provocan pérdidas económicas considerables en todas las explotaciones porcinas, los problemas respiratorios en los cerdos son una preocupación para la producción porcina la cuál ocupa un lugar muy importante dentro de la producción nacional, ya que esta enfermedad incide gravemente en la productividad de la granja, al momento del sacrificio se ha observado que de un 50 hasta un 90% de los cerdos presentan alguna lesión neumónica. Según Peter H, Ciprián A. y Hill RJ. El impacto en costo por lesiones neumónicas se calcula a través de un minucioso examen en la línea de sacrificio, por lo que se estima, que por cada 1% de pulmón afectado por Neumonía Enzoótica, se reduce el crecimiento 2.2 g /día. (Álvarez RM.)

Debido al carácter crónico, el costo de esta enfermedad para la industria porcina es enorme, ocasionando pérdidas por una deficiente ganancia de peso diario y retraso en el crecimiento. La enfermedad se presenta sobre todo en animales que se crían en condiciones intensivas y se presenta como producto de la interacción entre factores ambientales, de manejo, y todos aquellos inherentes al huésped y al agente etiológico en especial cuando el clima es húmedo y frío, por lo que se ha calculado que si hay 10% de tejido pulmonar afectado, el cerdo sufre retraso de 5% en la ganancia de peso. (Álvarez RM., Cruz ST y Calsamiglia M.)

1.3 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL *Mycoplasma hyopneumoniae*

El nombre genérico *Mycoplasma* se deriva del griego “MYCO” que quiere decir filamento o micelo y del latín “PLASMA” que se refiere a la plasticidad y pleomorfismo del mismo; además este microorganismo pertenece al grupo de los micoplasmas que son nutricionalmente exigentes para su crecimiento destacándose su extrema lentitud esto da lugar a que otros microorganismos oportunistas aparezcan lo que dificulta mucho su cultivo. Estos son microorganismos procariotas más simples y diminutos de vida libre que se dividen de las eubacterias en una clase diferente denominada Mollicute; en el cerdo se reconocen diferentes micoplasmas y acoleplasmas, entre los que *Mycoplasma hyopneumoniae* es el más importante, ya que produce neumonía micoplasmática porcina (NMP) o Neumonía Ezoótica.

(Cruz ST, Ciprián A, Hill RJ. y Cruz ST.)

Los micoplasmas pertenecen a la siguiente clasificación:

REINO: Procariota

CLASE III: *Mollicutes*

ORDEN: *Mycoplasmatales*

FAMILIA: *Mycoplasmataceae*

Hábitat: hombre y animales

GENERO: *Mycoplasma* (64 especies)

En la actualidad se han descrito cinco géneros sin pared celular, de los cuales los tres primeros son los más importantes en animales:

- ***Mycoplasma***: Son fermentadores de glucosa no hidrolizan la urea; crecen a pH neutro y requieren esteroides en el medio cultivo (64 especies).
- ***Acholeplasma***: No requieren esteroides para su crecimiento, genoma de 1.0×10^6 a 9×10^6 daltons; oxidación del NADH localizada en membrana (7 especies).
- ***Ureoplasma***: Fermentan la urea, crecen bien en pH ácido y requieren esteroides.

Debido al pequeño tamaño de sus colonias se describieron durante algún tiempo como micoplasmas T (“Tiny”, pequeño) (2 especies). (Peter H, Cruz ST).

- ***Spiroplasma***: Son organismos helicoidales, en algunas etapas de crecimiento; requiere esteroides para crecer; se han aislado de insectos, garrapatas y diversas plantas (3 especies).
- ***Formas L***: Carecen de pared celular, la pérdida de ésta puede ser completa o parcial (algunas tienen pared deficiente) y la célula madre puede ser Gram negativa o positiva. Son pleomórficos como los mycoplasmas y continúan reproduciéndose por mutaciones espontáneas o después de tratamientos, como el cultivo en medios isotónicos o hipertónicos que contienen penicilina. (Hill RJ. Y Morilla AG.)

Mycoplasma hyopneumoniae

Pertenece al grupo de las bacterias de menor tamaño (celular y de genoma) y se caracteriza por ser exento de pared celular. Por esta razón es un microorganismo lábil y muy susceptible a la lisis mediada por anticuerpos o por ósmosis.

Es un agente primario capaz de desencadenar el proceso neumónico, pero por sí sólo produce lesiones de poca importancia. Por otro lado, ***Pasteurella multocida*** se visualizó como agente incapaz de montar una infección primaria, pero responsable de las lesiones severas. Morrison y Pijoan, demostraron que en pulmones colectados de cerdos de abasto ***Mycoplasma hyopneumoniae*** y ***Pasteurella multocida*** interactúan sinérgicamente. (Álvarez RM, Morilla y Lobo E)

El microorganismo se caracteriza por pasar a través de una membrana filtrante de 450 nm de tamaño de poro que otros microorganismos no pueden pasar, obteniendo sólo al mycoplasma, cual tiene un tamaño de 0.2 y 0.8µm, Gram (-), inmóvil es microaerofílico. En cuanto a sus características bioquímicas es: oxidasa negativo, catalasa negativo, presenta metabolismo respiratorio, motilidad negativa. La mayoría de las especies de mycoplasmas utilizan glucosa como principal fuente de energía. Las placas de agar se incuban normalmente entre 2 y 10 días, hasta que el crecimiento es aparente, aunque las colonias raramente son suficientemente grandes como para poder observarse a simple vista. Es un microorganismo de crecimiento lento, tarda de 7 a 10 días en crecer y su mayor crecimiento es en medios líquidos. Sólo prolifera en medios de cultivo complejos que contengan suero porcino o de caballo, extracto de músculo cardíaco, peptona y extracto de levadura como complemento nutritivo. Además requiere colesterol para su desarrollo y fermenta la glucosa, no hidroliza la urea, presenta una proteína de un peso molecular (PM) de 64,000 daltons específica, es inactivado a las 48 hrs. de secado en la ropa o pelo, pero puede persistir por más de 17 días en el agua de lluvia entre los 2 °C y 7°C, a una temperatura de -20°C permanecen vivos durante meses).

Los medios deben contener acetato de talio y penicilina para impedir el crecimiento de bacterias que puedan contaminar el medio de cultivo, en condiciones microaerofílicas (5-10% de CO₂) y en medios sólidos forman colonias después de 2 a 10 días. Las colonias presentan en medio sólido morfologías peculiares, se caracterizan bien por la existencia de una zona central granulosa y una periférica más lisa que constituye la llamada forma de “huevo estrellado” o bien presenta una granulación uniforme sin distribución especial, si no homogénea en toda la superficie de la colonia algunos autores la observan como “gotas de rocío” tamaño de 0.5-1mm de diámetro. (Álvarez RM y Hill RJ.)

Para el examen de las colonias se utiliza la tinción de Dienes, en esta tinción se utilizan los colorantes, azul de metileno y el azul de azur II, se usa para teñir las colonias de mycoplasmas. Las colonias se tiñen de color azul oscuro en el centro y de azul claro en la periferia. También se encuentran los medios de EATON, FRIIS, PPLO (Organismos productores de pleuroneumonía) y Yamamoto, que contienen sueros estériles de equino, extracto de levadura, indicador de pH (rojo de fenol), más inhibidores de agentes contaminantes. (Morilla AG.)

En frotis teñidos con colorante de Giemsa se aprecian formas bacilares pequeñas, cocoides delgados de 0.1 a 0.2 μm de diámetro y formas con prolongaciones filamentosas de 0.1 a 0.2 μm de grosor. En cultivos celulares crece formando grupos difusos como cocos de 0.5 μm de diámetro en cadenas cortas o anillos de sello bipolar y triangular aproximadamente de 3 μm de diámetro conteniendo una estructura parecida a un COCO. (Según Rodríguez VR y Morilla AG)

1.4 TRANSMISIÓN

La transmisión de las bacterias respiratorias ocurre sobre todo por contacto directo y por las secreciones nasales y faríngeas; el medio principal de la diseminación es de cerdo a cerdo. Así la transmisión del *M. hyopneumoniae* se da por contacto directo o a través de aerosoles entre cerdos infectados (fase aguda) o cerdos portadores convalecientes y cerdos sanos. (Álvarez, Calsamiglia M, Zimmerman JJ y Lobo E)

Done en 1997 menciona que la transmisión de *Mycoplasma hyopneumoniae* es lenta y principalmente por contacto nasal entre animales. Goodwin en 1984 y Thomsen en 1997 propusieron otra vía de transmisión, como a través de fómites. Si el contacto directo es la única ruta de transmisión, la enfermedad sólo podría entrar en una granja por la introducción de animales infectados. El padecimiento también se trasmite y se exagera durante el

agrupamiento, el estrés que sufren los cerdos al destetarlos y del período de crecimiento hasta la edad comercial de los animales. La temperatura y la humedad también modifican la penetración a los pulmones, tanto de patógenos primarios como secundarios, por que alteran el tamaño de partículas de aerosol infectadas y el mecanismo protector de las vías respiratorias. (Calsamiglia M, Alvarez RM y Fuentes M).

Ross propuso en 1986, tres mecanismos por lo que la infección de *Mycoplasma hyopneumoniae* se mantiene en una granja:

- Transmisión de madres infectadas a lechones
- De lechones infectados a otros no infectados en las parideras
- En salas de cuarentena de animales a otros más jóvenes que entran en dichas instalaciones.

Por ello, el conocimiento de la dinámica de transmisión del organismo dentro de un grupo de cerdos es crítico para establecer medidas de control en una granja en particular. Los agentes etiológicos suelen clasificarse en primarios y secundarios según la repercusión que tiene su circulación en la población sobre el estado sanitario de la misma. Los agentes primarios son capaces de producir por si mismo la enfermedad y además propician las patologías desencadenadas por los agentes secundarios. (Bach HP, Rodríguez S. y Fuentes M.)

1.5 PATOGENIA

El micoplasma inhalado se deposita en las márgenes centrales de los pulmones y se establece en el epitelio bronquial y bronquiolar, la población de este se incrementa y avanza a lo largo del árbol respiratorio y se concentra sobre todo en los cilios, de donde es probable que parta hacia los alvéolos. (Álvarez RM).

Estos hallazgos muestran que la adherencia de *Mycoplasma hyopneumoniae* es específica del hospedador y que está mediada por proteínas y carbohidratos que se localizan en la superficie del micoplasma y por moléculas que contienen azufre que se encuentra en la membrana de las células del cerdo. (Según Peter H.)

El micoplasma induce la pérdida de cilios mediante la elaboración de una o varias enzimas; de esta forma, si las células epiteliales (seudo estratificadas columnares) de la tráquea y los bronquios, la secreción mucosa y los macrófagos alveolares están afectados, la remoción de

partículas y microorganismos patógenos, en este caso micoplasma, no se lleva a cabo. Una vez que los cilios se pierden, el microorganismo coloniza como resultado de la disminución del movimiento protector de la cubierta mucosa que facilita su adhesión a las partes fijas de las células respiratorias. Por lo general la patogenicidad de los micoplasmas se debe a la capacidad para adherirse a la célula hospedadora. (Calsamiglia M)

El período de incubación del *Mycoplasma hyopneumoniae* ha sido reportado de 10 a 16 días en condiciones naturales, Betts en 1952 demuestra que en caso de transmisión experimental el período de incubación es de 5 a 12 días. El *Mycoplasma hyopneumoniae* es específico de su hospedador, y en el medio externo sólo sobrevive por poco tiempo. El microorganismo se disemina en las gotitas de flujo producidas por los cerdos infectados y las cerdas pueden transmitirlo de esta manera a sus lechones; igualmente puede ser introducida la enfermedad a la piara por la compra de cerdos infectados. (Calsamiglia M, Arcana C y Hans P.)

Se ha reportado signos de la enfermedad en los cerdos de 2 a 10 semanas de edad, aunque por lo general se disemina lentamente y muchos cerdos no presentan la enfermedad, hasta que tienen entre 3 a 6 meses de edad. El cerdo infectado elimina aerosoles contaminados que son captados por el sistema respiratorio de un cerdo susceptible, *Mycoplasma hyopneumoniae* coloniza el epitelio ciliado del área traqueal, bronquial y bronquiolar por medio de receptores glucolípidicos presentes en estas células, donde puede permanecer por largos periodos y al parecer, por medio de una proteína citotóxica produce la destrucción de los cilios; además la colonización del tracto respiratorio implica una adhesina llamada P97, de esta manera se inicia una respuesta del organismo a través de una infiltración de células mononucleares, principalmente linfocitos, localizados peribronquialmente. Esta infiltración celular está mediada por un factor mitógeno proteico. Esta respuesta tiene un efecto inmunosupresor, ya que interfiere en la remoción bacteriana que usualmente utiliza el sistema respiratorio como mecanismo de defensa, suprimiendo la inmunidad humoral por la inhibición de linfocitos B y la inmunidad celular por la inhibición de la fagocitosis mediada por macrófagos. Una vez establecida la inmunosupresión, los agentes bacterianos como *Pasteurella multocida* tipo A, tipo D toxigénica, *Actinobacillus pleuroneumoniae* u otros, pueden generar una infección secundaria. Además se sabe que el virus PRRS compromete al sistema inmunológico del cerdo permitiendo que la neumonía causada por *M. hyopneumoniae* sea más severa. (Hill y Cruz)

Hay varios cambios morfológicos por causa de la Neumonía y se dividen en las siguientes etapas:

1. Etapa temprana: (7 a 28 días pos-infección) se observa presencia de leucocitos polimorfonucleares (PMN) y pérdida de cilios en la luz de los bronquios, los bronquiolos y los alvéolos; conforme la lesión progresa, hay un incremento del número de linfocitos en el tejido peribronquial, peribronquiolar y perivascular, y una mezcla de infiltrado celular y edema en las células alveolares. (Peter H, Álvarez RM y Sartk K.)
2. En la etapa de infección establecida (17 a 40 días de duración): Hay proliferación extensa de tejido linforeticular en áreas peribronquiales y perivasculares penetración de linfocitos, disminución de (PMN) y edema en la lámina propia.
3. En la etapa de convalecencia (69 a 262 días): Se presenta colapso alveolar, enfisema e incremento de nódulos linfoides hiperplásicos alrededor de bronquios y bronquiolos; más lesiones en los lóbulos craneal y medio; afección de los lóbulos accesorio o intermedio en su parte ventral y de los lóbulos caudales en las porciones craneoventrales. (Peter H, Álvarez RM y Cruz ST.)

1.6 SIGNOLOGIA

Los signos clínicos de la Neumonía Enzoótica son variables según la fase evolutiva de la enfermedad, pero siempre se observan en un grupo de animales y no de forma individual

Los primeros signos clínicos que se observan en infecciones naturales agudos son anorexia, respiración abdominal, hipertermia moderada e inapetencia, aunque en algunos casos la tos es posiblemente el único signo apreciable en las primeras fases de la enfermedad. Su aparición es lenta, comienza a partir de los 6 días postinfección, con un pico a los 27 días y prácticamente desaparece a los dos meses.

En otros casos, la tos aparece en la fase crónica de la enfermedad y se hace entonces persistente. Se caracteriza por presentarse principalmente en la madrugada o muy temprano en la mañana, es seca, puede estar acompañada por estornudos aunque los movimientos respiratorios sean normales y resulta especialmente característica cuando se mueven los animales tras un período de reposo. Estos signos clínicos se pueden observar en el 30 - 70% de los animales

Otros signos clínicos como artritis, cojera lesiones serofibrinosas, relacionados con la infección de *Micoplasmas* son poco frecuentes, aunque algunos trabajos hacen referencia, como por ejemplo en inoculaciones con cepas de campo

La Neumonía Enzootica se puede encontrar asociada a bacterias y/ o virus con tropismo que afectan el aparato respiratorio y que han dado lugar a que modifique la signología.

Dependiendo del tipo de agente con el que se complica, puede haber disnea, brinco, baja de apetito, fiebre, postración, pelo erizado, baja en la ganancia diaria de peso (GDP) y tasa de crecimiento, con cerdos retrazados y enanos. (Álvarez RM y Hill RJ).

En la neumonía enzoótica del cerdo hay una alta morbilidad con un baja mortalidad y las manifestaciones son una tos crónica, seca y no productiva que se exagera con el ejercicio y persiste por 3 semanas o más, también se observa dificultad respiratoria, pelambre hirsuto, estornudo y en algunos casos diarrea, probablemente por debilidad del animal y disminución del apetito, lo cuál trae como resultado la reducción en la tasa de crecimiento, así como la disminución de la eficiencia alimenticia. Además los animales pueden permanecer deprimidos, la intensidad de la manifestación clínica es mayor en cerdos en la etapa de crecimiento y finalización, aunque se han reportado manifestaciones desde las 3 semanas. Los movimientos respiratorios son normales a menos que el daño pulmonar sea extenso o se desarrolle una infección bacteriana secundaria. Las pérdidas por muerte asociadas por infección bacteriana y estrés pueden ocurrir entre los 4 y 6 meses de edad. (Peter H, Hill RJ y Lobo E).

Se pueden apreciar dos presentaciones:

FORMA AGUDA: Relativamente rara, pueden aparecer brotes graves en piaras susceptibles cuando llega la infección por primera vez, enferman animales de todas las edades alcanzando morbilidad hasta de un 100%, manifiestan anorexia, pirexia de 40.6 a 41.7 °C y molestias respiratorias acompañadas de tos. Los verracos pueden no trabajar, y pueden retrasarse los intervalos destete-servicio, infectando crías de 10 días de edad. La evolución de la enfermedad en una piara requiere aproximadamente 3 semanas, posteriormente tienden a la cronicidad. (Álvarez y Morilla)

FORMA CRÓNICA: Es mucho más frecuente en animales que se enferman cuando tienen 3 a 10 semanas de edad; los cerdos comienzan con una diarrea transitoria y una tos seca repetitiva por la mañana y al alimentarse (es la manifestación principal), alteración de los movimientos respiratorios, no presentan fiebre, ni anorexia evidente, disminuye la tasa de

crecimiento, los cerdos pueden llegar a sufrir neumonía aguda por invasión secundaria, puede provocar brotes de tos y neumonía que son particularmente intensos en cerdos de 2 a 4 meses de edad. (Álvarez RM. y Morilla)

1.7 LESIONES MACROSCÓPICAS

El aspecto macroscópico de las lesiones depende del curso de la enfermedad.

La distribución de las lesiones se caracteriza por una consolidación lobular definida de color gris pálido en estadios iniciales, que va progresando con los lóbulos cardiaco derecho, cardiaco izquierdo, apical derecho, lóbulo diafragmático, y lóbulo apical izquierdo, en este orden de frecuencia; consisten en áreas neumónicas hepatizadas, que pueden ir desde una coloración rosáceo o grisáceas hasta llegar a moradas o púrpura.

En estadios ya avanzados de la enfermedad el área pulmonar se observa inflamada, brillante, de distribución lobular y de color púrpura. (Álvarez RM y Ciprián A).

Se ha sugerido que esta distribución depende en parte de la posición más vertical de los bronquios en casi todos los lóbulos comúnmente afectados. Los nódulos linfáticos bronquiales y mediastínicos asociados pueden estar agrandados. Underahl y colaboradores en 1980 demostraron que en caso de infección experimental con el agente sólo, las lesiones empiezan a aparecer de los 7-10 días post-infección, alcanzando el máximo a los 20-30 días.

(Peter H, Álvarez RM y Ciprián).

1.8 LESIONES MICROSCÓPICAS

Los primeros cambios histológicos aparecen tres días después de la infección y consisten en inflamación con congestión de los capilares de los tabiques alveolares, la acumulación de polimorfos y neutrofilos con la presencia de bacterias secundarias como *Pasteurella*, en las vías respiratorias y la lámina propia de los bronquiolos. Cinco días post-infección aparecen linfocitos y macrófagos, y para el séptimo día se visualiza la proliferación del BALT (Tejido linfoide nodular asociado a mucosas) alrededor de los bronquiolos. Al mismo tiempo los alvéolos pulmonares contienen muchos macrófagos, linfocitos y plasmocitos. Se produce hiperplasia del epitelio bronquiolar y proliferación de neumocitos tipo II. Entre los cambios posteriores se incluyen proliferación del tejido linfoide que causa oclusión de algunos bronquiolos, hipertrofia de las glándulas bronquiales. Con el tiempo los animales afectados se recuperan y se manifiesta una regresión de las lesiones. (Cruz ST y Hill RJ).

1.9 DIAGNÓSTICO

Por lo general el diagnóstico de Neumonía Enzoótica se lleva a cabo basándose en la observación de la signología clínica de los animales en la piara y no de un solo animal, la morbilidad alta y mortalidad baja, la diferencia de tamaño corporal entre animales enfermos y sanos, como consecuencia de diferentes grados de infección en la piara. Esto provoca retrasos en la comercialización y problemas de manejo. El diagnóstico presuntivo se realiza sobre la base de las condiciones epizootiologías de la enfermedad, la historia clínica, la signología, las lesiones a la necropsia y los resultados histopatológicos; el diagnóstico confirmativo es importante llevarlo a cabo mediante pruebas y técnicas del laboratorio. (Cruz ST).

En la mayor parte de los casos el diagnóstico de NE se basa en la observación de las lesiones macroscópicas e histopatológicas, aunque las características no siempre son específicas. Sin embargo para el diagnóstico definitivo es necesario combinar diversos aspectos. (Cruz ST y Hans P).

Se han efectuado diferentes métodos para la evaluación del grado de lesión pulmonar en la línea de sacrificio y en trabajos de investigación como las técnicas de evaluación del porcentaje de lesión pulmonar en los cuales se citan algunas de ellas:

a. Técnica de planimetría:

Esta técnica fue empleada para evaluar las lesiones macroscópicas de los pulmones dañados por primera vez en 1987 por Abel Ciprián, en donde por medio de diagramas pulmonares normalizados de vista dorsal y ventral, calculó el promedio del área dañada de ambas vistas de pulmones de porcinos con lesiones neumónicas y calculó el porcentaje del área ocupada por las lesiones, tomando como base el porcentaje del área del pulmón. (Álvarez RM)

b. Técnica de Análisis digitalizado de Imágenes:

Es una técnica que se basa en las mediciones geométricas. Su principal aplicación es la microscopía cuantitativa para las que ofrece datos estadísticamente significativos de una manera rápida y exacta sustituyendo así a los subjetivos métodos tradicionales.

El análisis digital de imágenes apareció por primera vez como técnica en 1963 como la introducción del QTM A (Microscopio televisión cuantitativo), diseñado por Metals Research Ltd., que más tarde pasó a formar parte de Leica. Estas mediciones son exactas y precisas, este programa es utilizado para hacer mediciones como por ejemplo de células o delimitaciones de lesiones dando un porcentaje más real, para esto se utilizan fotografías de lo que se quiere evaluar y después se carga al programa de cómputo para ser analizadas. ⁽¹⁾ Actualmente se utiliza un programa más reciente llamado Image Pro Express versión 4

Dentro de algunas pruebas del laboratorio que se utilizan para diagnóstico se encuentran:

a. Inmunofluorescencia:

También conocida como técnica de anticuerpos fluorescentes, aunque posiblemente este nombre no sea apropiado, ya que podría aplicarse también a los antígenos fluorescentes cuando se conjugan con un colorante. El principio de esta prueba es el mismo que para otros procedimientos inmunológicos que incluyen reacciones antígeno-anticuerpo. En este caso, las moléculas de anticuerpos se conjugan químicamente a los fluorocromos, sin destruirse su especificidad inmunológica, y cuando se ponen en contacto con el antígeno homólogo se produce la reacción antígeno-anticuerpo. A la observación al microscopio de luz ultravioleta, el complejo emite un color fluorescente que dependerá del fluorocromo empleado para conjugar los anticuerpos. Los colorantes más empleados en la técnica son: ^(Cruz)

Derivados de la fluoresceína: El isocianato de fluoresceína (ICF) y el isotiocianato de fluoresceína que han sido empleados con éxito como marcadores de proteínas. Otros derivados como la aminofluoresceína diazotizada y los cloruros ácidos de fluoresceína no producen conjugados óptimos. La reacción de conjugación del colorante a la proteína se da por medio de la sal con el grupo amino libre, principalmente en el de las lisinas, esta se conjuga mejor por medio de la sal isotiocinato. El compuesto puro, cristalino, resulta caro, pero proporciona mejores resultados. ^(Cruz ST)

Derivados de la rodamina: Isocianato e isotiocinato, ya que los radicales para unirse a la proteína son iguales que los de la fluoresceína, se supone que los mismos sitios de unión de la proteína son válidos para la rodamina. La lissamina rodamina B-200 reacciona con el pentacloruro de fósforo y produce el derivado de cloruro sulfonil. Las condiciones de unión con la proteína son las mismas que para los isotiocinatos con requerimientos especiales para compensar la acidez del cloruro de fósforo empleado en la preparación del cloruro. ^(Cruz ST)

Dentro de la técnica de Inmunofluorescencia se han utilizado dos técnicas diferentes para realizarla dentro de las cuales se mencionan las siguientes:

Prueba de Inmunofluorescencia Directa: Para mantener la integridad bronquiolar y evitar que el epitelio mucociliar se desprenda durante el manejo de las muestras, se recomienda el empleo de un crioprotector que puede ser Tissue Tek o Jung. Se toma una porción del pulmón procurando contenga bronquio, congelar éste a -70°C . Esta es la mas simple de las reacciones, se le agrega unas cuantas gotas del conjugado diluido sobre el antígeno adherido al portaobjetos. (Cruz ST)

Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta: En este método, los anticuerpos que van a reaccionar con un antígeno son por sí mismos antígenos que reaccionarían con un conjugado específico contra las inmunoglobulinas. (Cruz ST).

Prueba de Epifluorescencia

Esta prueba se emplea para la identificación de colonias de mycoplasmas. (Cruz 2000)

Cultivo:

El cultivo de *Mycoplasma hyopneumoniae* es tedioso y conlleva mucho tiempo y no es accesible en la mayoría de los laboratorios; su crecimiento es muy lento y además en el tracto respiratorio del cerdo puede encontrar de forma habitual *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma flocculare* microorganismos de fácil crecimiento lo cual llega a dificultar mucho el cultivo.

El cultivo se realiza en medios complejos como los descritos por (Friis y Goodwing). Su primer aislamiento solo se consigue en medios líquidos, en el medio de Friis crece lentamente, entre 7 y 15 días de incubación, la rapidez de su desarrollo es mayor si la incubación en el medio se realiza a 37°C con el 5 al 10 % de CO_2 y en medios sólidos forman colonias después de 2 a 10 días, las colonias presentan morfologías peculiares, se caracterizan por la existencia de una zona central granulosa y una periférica más lisa que constituye la llamada forma de “huevo estrellado” o bien presenta una granulación uniforme sin distribución especial, algunas colonias se observan como “gotas de rocío” de un tamaño de 0.5-1 mm de diámetro. (Hill RJ, Hans P y Peter H.)

Además la histopatológica ofrece una importante información acerca de las lesiones, pudiendo posteriormente aplicarse técnicas de identificación, como la IF, IHQ, Microscópica Electrónica y Biología Molecular. Recientemente, y a partir de hisopos nasales, muestras de aire y muestras de tejidos, se están desarrollando técnicas de PCR para detectar Mh. La técnica de ELISA para detectar anticuerpos frente a Mh es de gran utilidad en el establecimiento de seroperfiles que permitan evaluar la dinámica de la enfermedad dentro de la granja.

2. JUSTIFICACION

Hoy en día realizar el diagnóstico de enfermedades respiratorias del cerdo especialmente Neumonía Enzótica, sigue siendo de gran dificultad por lo que con este trabajo se busca conjuntar distintas técnicas de diagnóstico para facilitar la identificación del agente primario, así como evaluar el grado de lesión a nivel de campo e implementar así estas técnicas en el área de diagnóstico Bacteriológico de la FES-C4.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Aplicar algunas de las técnicas para el diagnóstico de la enfermedad de Neumonía Enzoótica y obtener así un diagnóstico más certero con la finalidad de su implementación dentro del servicio de Diagnóstico Bacteriológico de la FES-C4.

OBJETIVOS PARTICULARES.

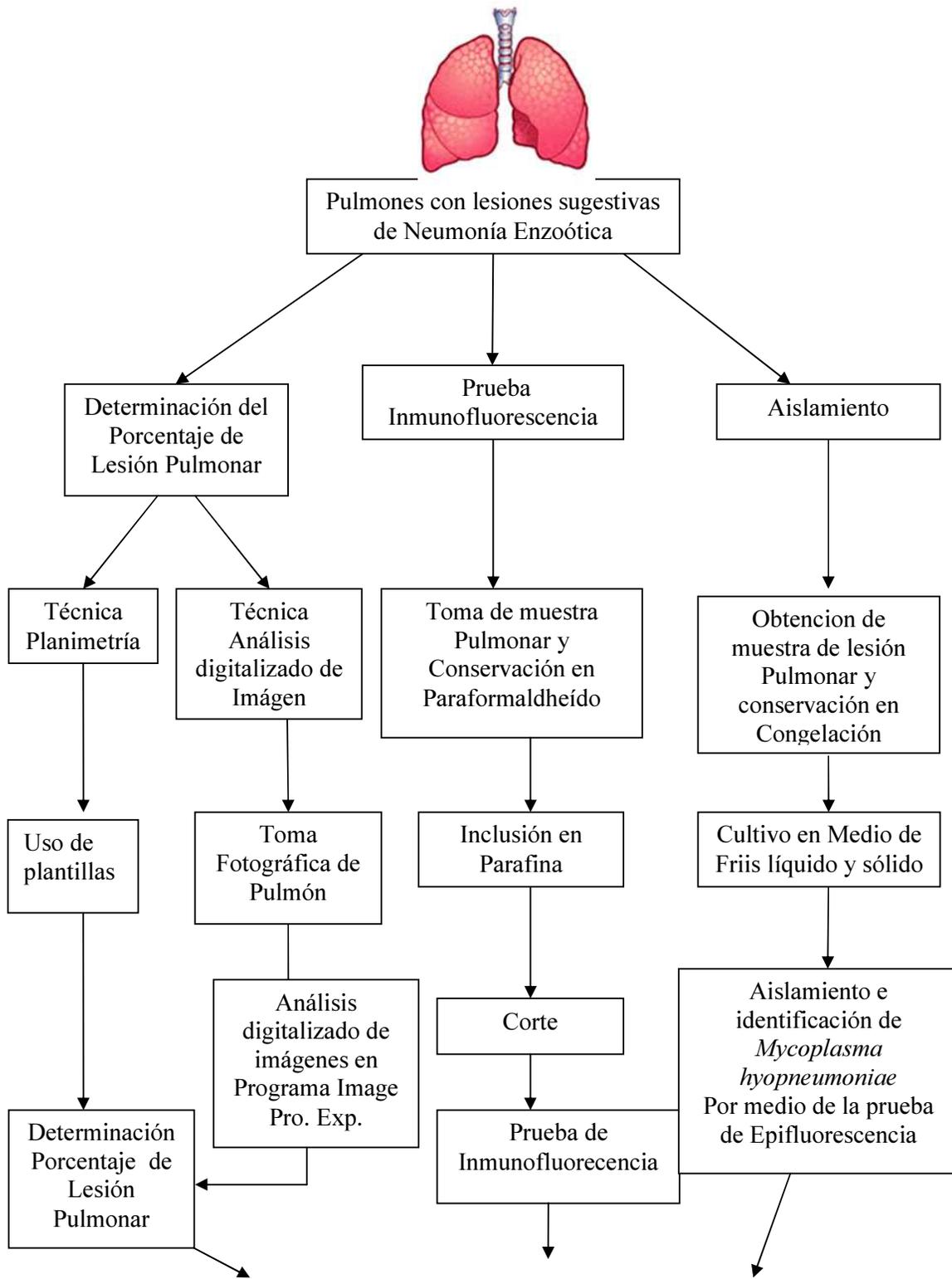
Realizar el montaje de las siguientes pruebas de diagnóstico:

1. Obtención de lesión pulmonar mediante la Técnica de Planimetría
2. Obtención del porcentaje de lesión pulmonar mediante la Técnica de Análisis Digitalizado de Imagen.
3. Realizar la técnica de Inmunofluorescencia para la identificación de *Mycoplasma hyopneumoniae*.
4. Cultivo y Aislamiento de *Mycoplasma hyopneumoniae*
5. Identificación de *Mycoplasma hyopneumoniae* por medio de la Prueba de Epifluorescencia.

En el diagrama No. 1 se muestra el diseño experimental del trabajo

Diagrama 1

Diseño Experimental



Integración al Servicio de Diagnóstico Bacteriológico Veterinario de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

4. Metodología

a) Material Biológico

25 pulmones con lesiones sugestivas de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

b) Material misceláneo

150 tubos de 10 ml de tapón de rosca

Filtro de 0.22 μ

Morteros

Jeringas de 3ml, 5ml y 10ml

Matraces de Erlenmeyer de 500ml y 1000ml

c) Equipo de cómputo

Programa Image pro express versión 4

Microscopio Leica Carl Zeiss

Cámara digital (Samsung) de 5 mega píxeles.

d) Material de Apoyo:

Diagramas de pulmones de cerdos de 3 a 12 semanas de edad.

4. Metodología:

Se obtenían los pulmones de animales de 3 a 12 semanas de edad provenientes de granjas del Estado de México circundantes a la FES- CUAUTITLAN, sospechosos de neumonías, estos eran conservados en congelación, para su posterior análisis.

Estos pulmones fueron trasladados en refrigeración y congelados a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC), al laboratorio de microbiología donde se llevo a cabo la selección de pulmones que presentaran lesiones sugestivas a *Mycoplasma hyopneumoniae*, se trabajaron 25 pulmones de los 150 recolectados

1. Técnica de planimetría.

Consiste en delimitar las lesiones del pulmón tanto del lado dorsal como del lado ventral en unos diagramas o plantillas de pulmón ya diseñado; estas son cuadrículadas y cada cuadro tienen una medida de 0.5cm² y el total de estos con ambas vistas son del 100% del área total del pulmón.

Una vez que se seleccionaron los órganos y se obtuvieron aquellos que tuvieron lesiones sugestivas de **M. hyopneumoniae**, se procedió a delimitar el área todas aquellas zonas lesionadas, de ambos lados. Posteriormente se realizó el conteo de los espacios de la cuadrícula que fueron sombreados. Se calculó el promedio del área ocupada por las lesiones neumónicas tomando como base el porcentaje del área total del pulmón, empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de la lesión} = \frac{(\text{No. LVD} + \text{No. LVV})}{2} \cdot .01$$

No. LVD= Número de lesiones de vista dorsal

No. LVV= Número de lesiones de la vista ventral

2 = Es la representación de las dos vistas

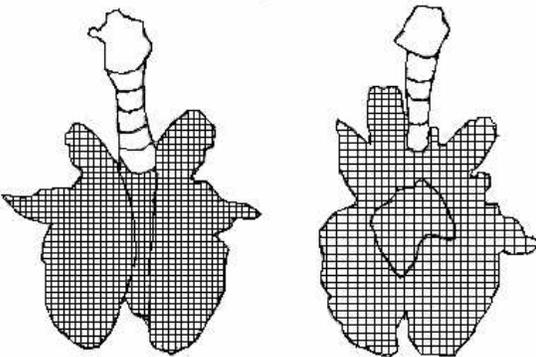
.01 = Es el porcentaje del pulmón total

Plantillas pulmonares.

**Reporte de localización de lesiones macroscópicas.
(PLANTILLA)**

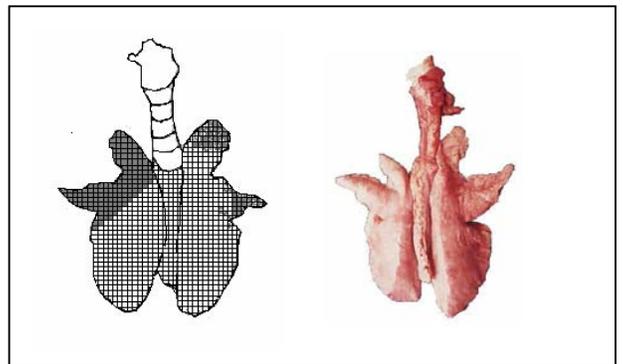
Cerdo No. _____ Lugar: _____

Fecha: _____



VISTA DORSAL VISTA VENTRAL

Observaciones:



Plantilla que se utilizó para registrar las zonas
O áreas de lesión, tanto dorsal como ventral.

2. Técnica de análisis digitalizado de imagen.

En el área de microscopía del laboratorio de microbiología, se procedió a tomar las fotografías de los pulmones lesionados a una distancia aproximadamente de 30 cm.; para las cuales se ocuparon cámaras digitales de la marca Samsung (Digimax S500) 5 mega píxeles, una vez terminado esto se procede a capturar las imágenes en la computadora usando el programa (Image Pro express versión 4), en el cual se evaluará el porcentaje de lesión.

Pasos a seguir en el analizador de imágenes:

1. Abrir programa de Image pro Express versión 4.
2. Dar clic en archivo para la selección de la foto que se va a utilizar.
3. Una vez seleccionada la foto dar clic en “calibration” y darle en cero.
4. Posteriormente ir a “measurement” y seleccionar la herramienta para delimitar .
5. se procede a delimitar las áreas lesionadas; en cada imagen se delimito el contorno tanto ventral y dorsal de los pulmones para obtener el área total de cada órgano.
6. Observar en la pantalla los datos de las áreas delimitadas en una hoja de cálculo.
7. Mandar los datos a una hoja de cálculo de Excel.
8. Realizar análisis estadístico.

PROCESO DE ANÁLISIS DIGITALIZADO DE IMAGEN

Fig. 1 Se muestra el equipo de cómputo utilizado para realizar la Técnica de Análisis Digitalizado de Imagen



Fig. 2. Nombre del programa utilizado

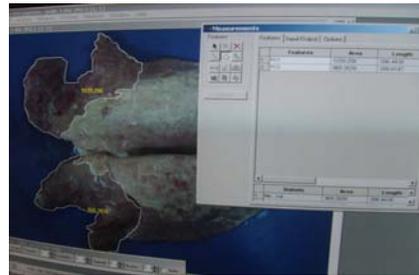


Fig. 3. Selección de la imagen para su análisis

Fig. 4. delimitación de áreas de lesión.



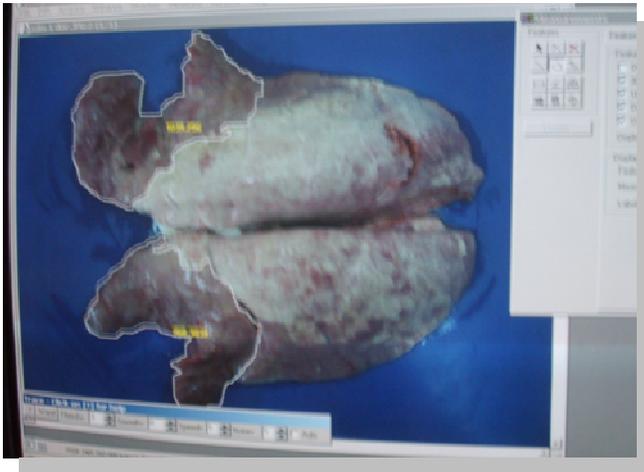
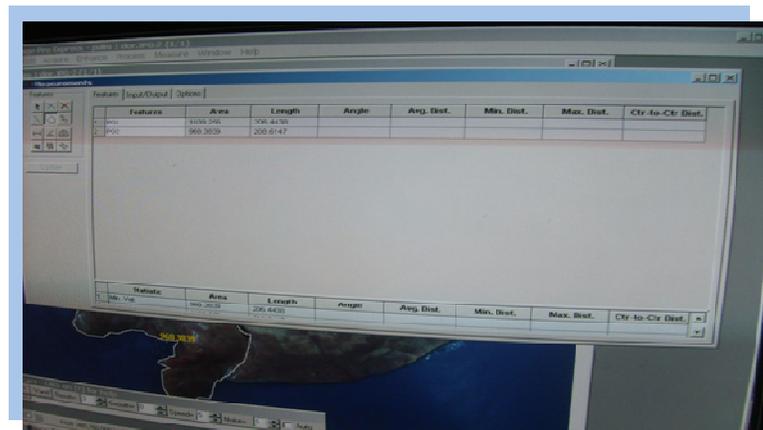


Fig. 5
Se observa la obtención del porcentaje de lesión del área ya delimitada

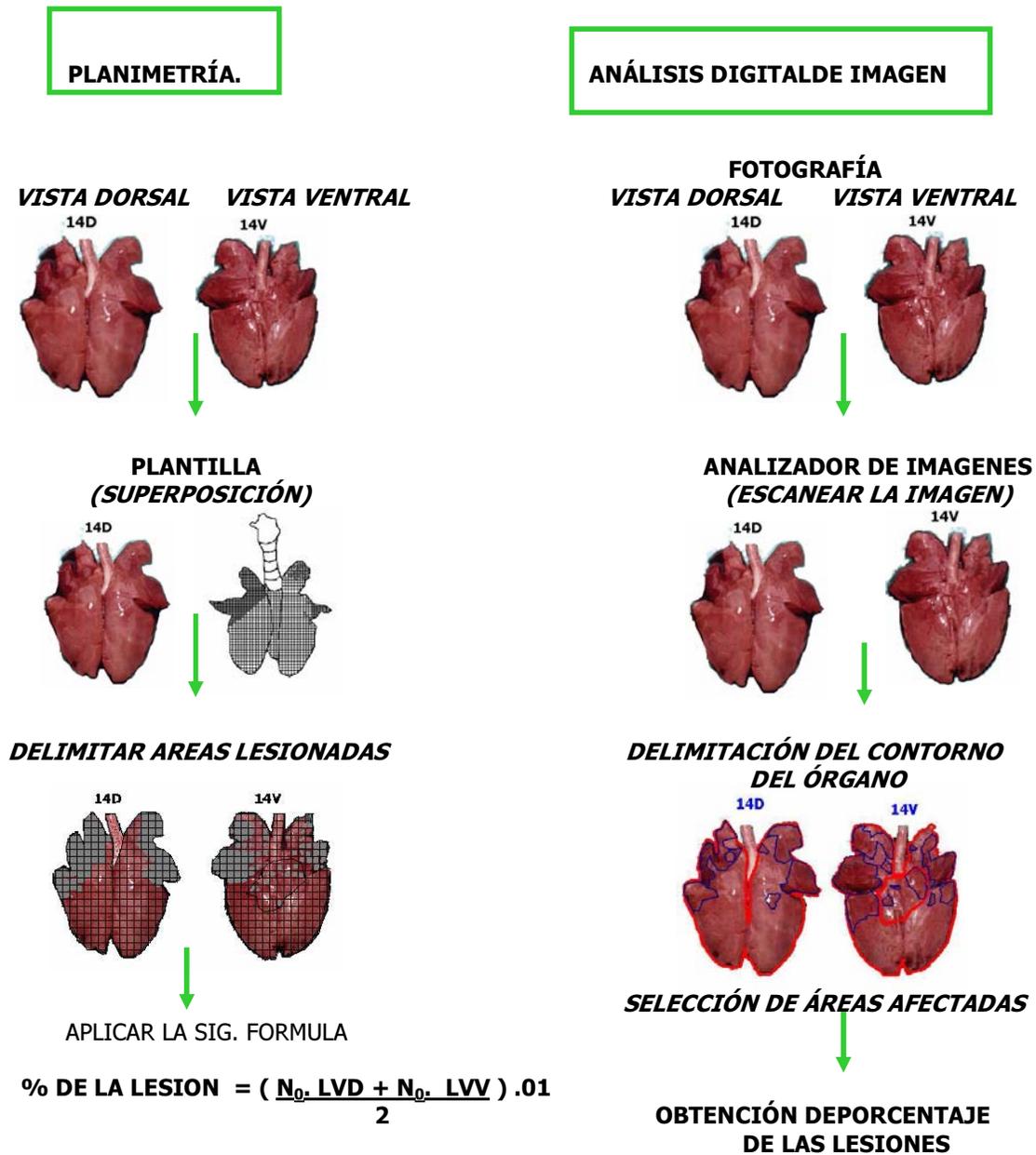
Fig. 6
Los datos obtenidos pasan hacia la hoja de Excel para su posterior análisis



La comparación de imágenes se muestra en el diagrama 2

Diagrama 2

DIAGRAMA DE COMPARACION DE AMBAS TÉCNICAS



3. Prueba de Inmunofluorescencia. Se tomaron 2 muestras una fue incluida en paraformaldeído al 4% para su conservación, fue procesada e incluida en parafina para realizar los cortes del pulmón y se procede a desparafinar posteriormente se hidrataron en agua destilada por 10min; posteriormente fueron pasados por 11 alcoholes desde el alcohol al 70% hasta llegar al 100%, después se lavo con PBS durante 10 min., se les agrego PBS mas Tween al 0.1% (detergente) durante 15 min., para obtener una mejor reacción a la prueba de inmunofluorescencia se le agrego un recuperador antigénico por 15 min., se lavo con PBS. Después se les aplica una gota de conjugado de fluorescencia. (Conjugado comercial específico para buscar *Mycoplasma hyopneumoniae*) se realizó según (Cruz ST 2004).

Que quede todo cubierta la muestra.

Incubar por 30 minutos en una cámara húmeda a 37°C

Lavar con solución fosfato o solución búfer fosfato (PBS) isotónica, pH 7.2-7.4, 1M, tres veces por 5 minutos.

Aplicar una gota de glicerina fosfatada sobre la preparación y poner encima un cubreobjetos.

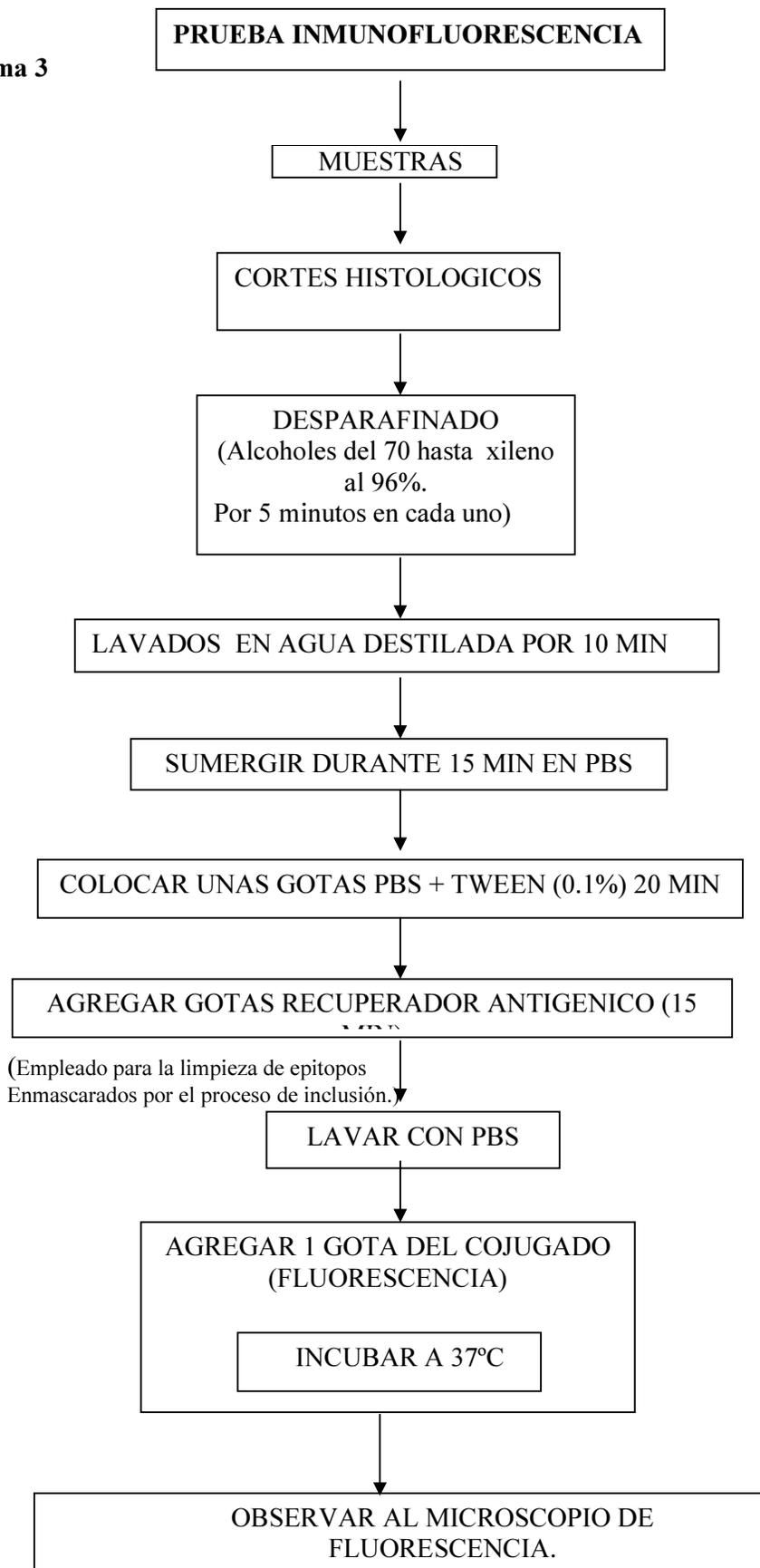
Observar al microscopio.

En una reacción positiva pueden apreciarse focos fluorescentes de color verde amarillentos adheridos al epitelio bronquial. ⁽⁷⁾⁽¹¹⁾

La otra muestra fue puesta en congelación a una temperatura de -20°C para posteriormente realizar el cultivo

Los pasos a seguir para realizar la IFA se muestran en el diagrama 3.

Diagrama 3



4. Aislamiento y Cultivo. : Esta prueba se realiza para aislar el agente involucrado y se requieren aproximadamente de 10 días para el crecimiento de este así que es un prueba tardada y laboriosa. (Cruz ST 2000).

La muestra congelada se utilizo para realizar el cultivo en medio de friis tanto líquido como sólido y se incubaron de 7 a 15 días.

Medios de cultivos utilizados para *Mycoplasma hyopneumoniae*

Medio HP “Hyopneumoniae” modificado por Friis. (Friis, 1969,1971; 1977, Boughton and Thorns, 1975, Ciprián , 1989.

Solución salina balanceada modificada de Hanks	152ml
Extracto de levadura estéril	18ml
Agua destilada	225ml
Infusión cerebro corazón (Difco)	2.5gr
PPLO Caldo (Difco)	2.5gr
Rojo de fenol (0.22%)	3.5ml
Suero inactivado de equino	100 ml
Penicilina G	1ml

El medio de Friis y el extracto de levadura se ajustaron a un pH de 7.4, estos y la solución de Hanks fueron esterilizados por separado por medio de filtración y fueron adicionados junto con los antibióticos al medio; que se distribuyo en tubos estériles 3ml cada tubo. Para la preparación del medio sólido se utilizó la misma base del medio líquido pero se adiciono agar noble a una concentración de 10gr para un litro de medio líquido.

Extracto de levadura:

Se suspendieron 50 gr. de levadura fresca de panadería en 100 ml de Solución Buffer de fosfatos (PBS) se calentó a 58- 80 °C durante 20 minutos, se ajusto el pH a 7.0 y se esterilizo por medio de filtración y se almaceno a -20 °C hasta su uso.

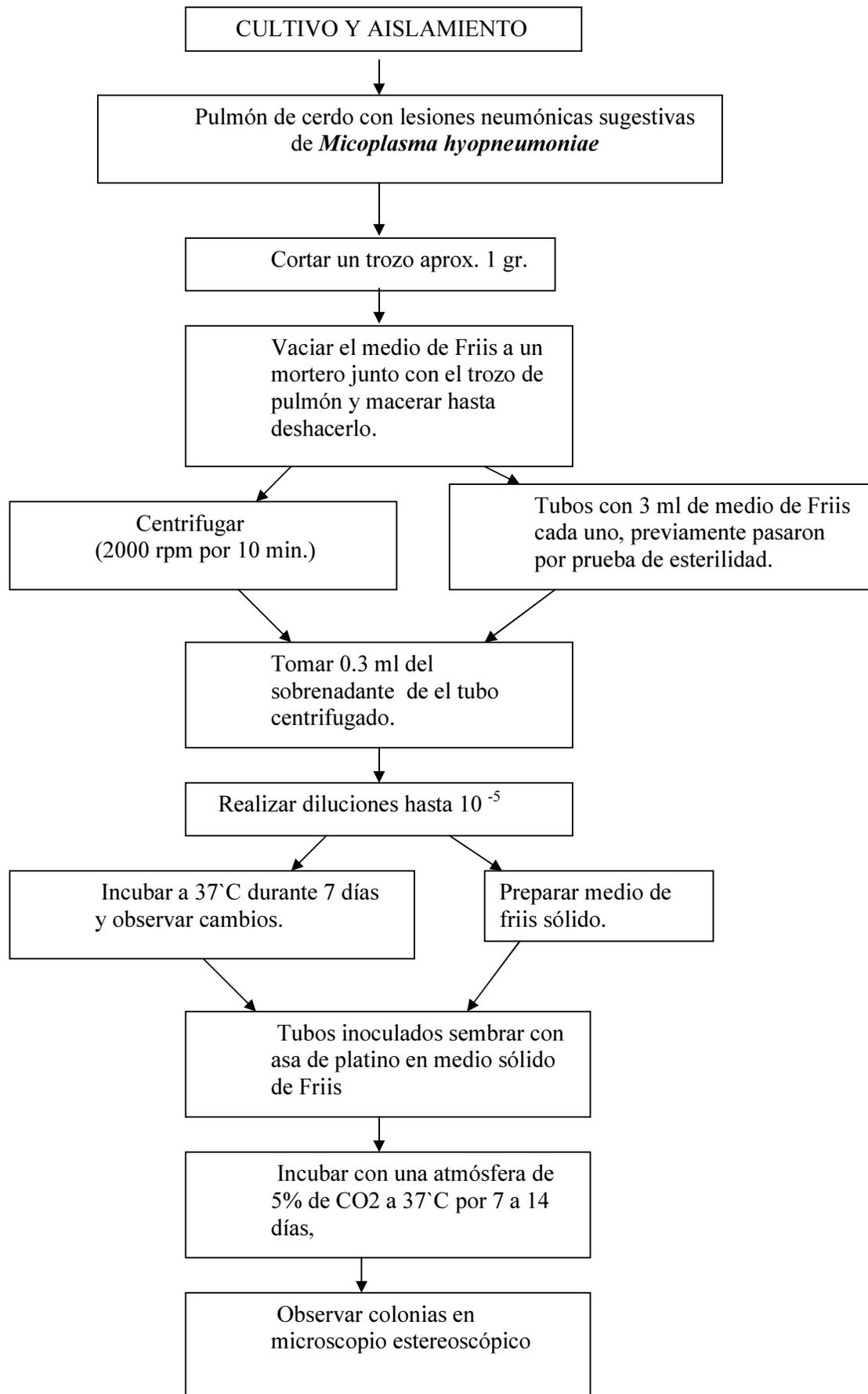
Medios básales:

Solución salina balanceada de Hanks (10x)

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 12HO	0.9 gr.
KH ₂ PO ₄	0.6 gr.
Agua des ionizada hasta	1000 ml

Los pasos a seguir para el cultivo y aislamiento se muestran en el diagrama 4.

Diagrama 4



5. Epifluorescencia: Prueba como apoyo inicial para la identificación de *Mycoplasma hyopneumoniae*; se realiza cuando en el primo aislamiento se observan colonias sospechosas de manera mas rápida que las pruebas bioquímicas (Cruz ST 2004).

Procedimiento

Sembrar los micoplasmas en medio sólido de Friis

Incubar durante 3 o 4 días a 37°C

Cortar varios bloques a un cm³ y colocarlos en portaobjetos

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

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

La observación de las colonias fluorescentes indica una reacción positiva. ⁽⁷⁾

5. RESULTADOS

1. Técnica de Planimetría

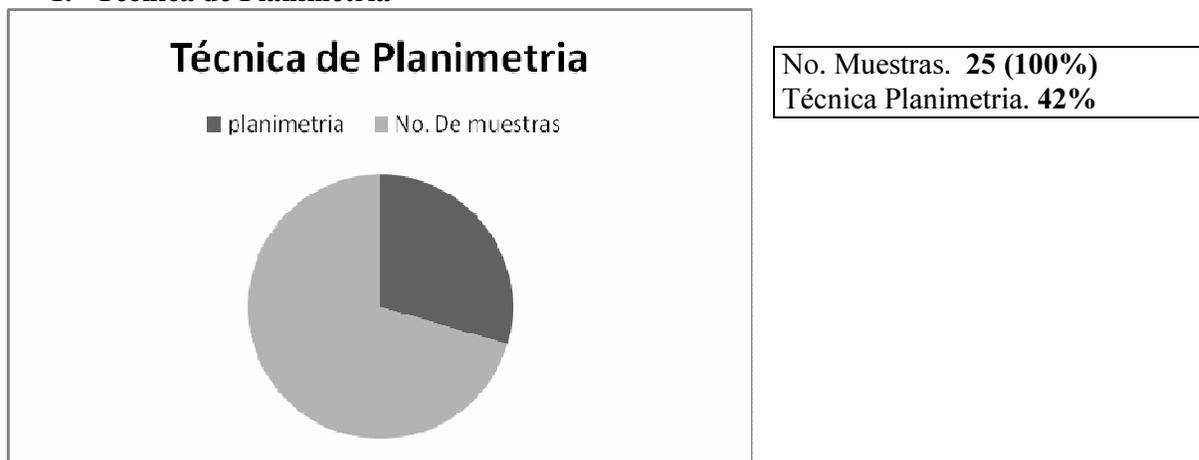


Fig. 7 La grafica muestra el porcentaje total de lesión pulmonar que se obtuvo por la técnica., después de haber analizado los 25 pulmones; En la cual se observo un 42% de pulmones con lesiones sugestivas de micoplasma.

Nota:

De acuerdo a los datos obtenidos se puede observar que la Técnica de Planimetría es más fácil de realizar y económica sin embargo está técnica presenta errores de precisión ya que dependiendo de cada persona es el porcentaje de lesión que observa.

Los resultados se pueden consultar en el cuadro 1

2. Técnica de Análisis Digitalizado de Imagen

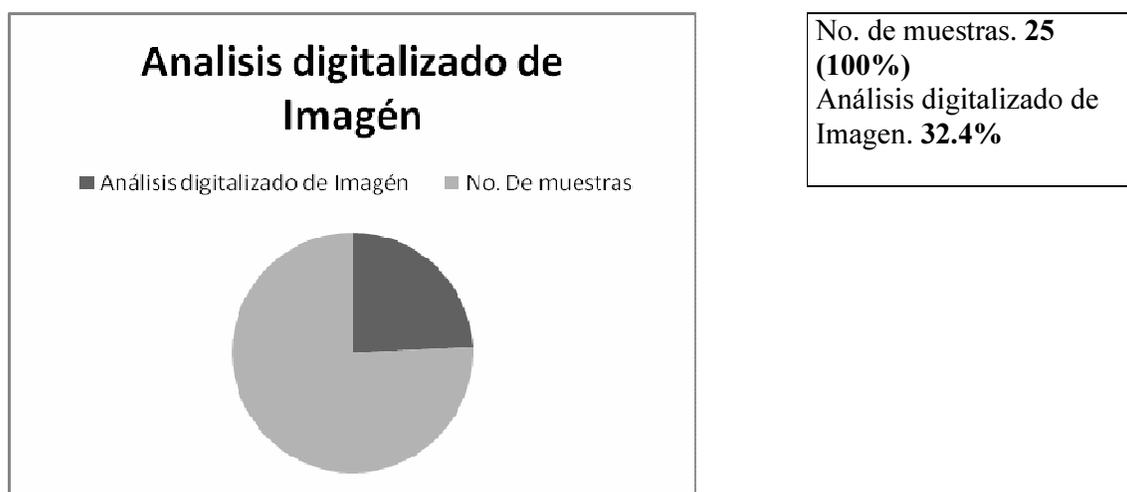


fig. 8. Grafica de la Técnica de Análisis Digitalizado de Imagen donde muestra un 32.4% de lesión pulmonar sugestiva de micoplasma.

Por otra parte la Técnica de Análisis Digitalizado de Imagen es una técnica avanzada que permite cuantificar de una manera más exacta las lesiones pulmonares, pero es costosa y de poca accesibilidad hacia el público y sólo se ha empleado a nivel de investigación. En esta grafica se puede observar que el porcentaje de lesión obtenido es menor al de la técnica de planimetría.

Se obtuvo un 32.4% de lesión de los 25 pulmones

Los resultados se pueden consultar en el cuadro 1

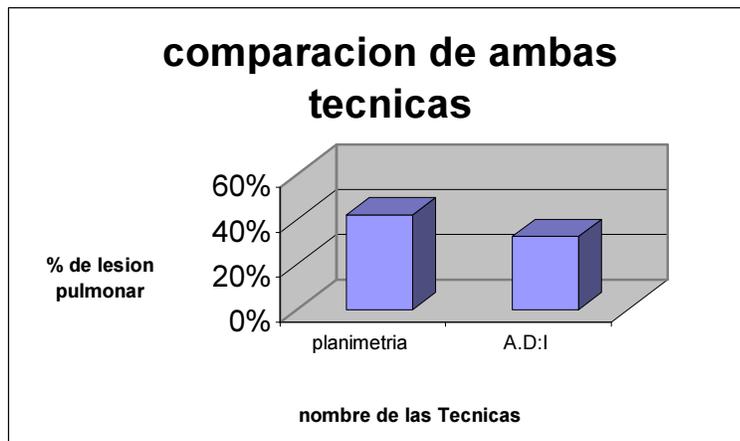


Fig. 9. Se muestra la diferencia entre ambas técnicas después de haber analizado los datos obtenidos. Teniendo una diferencia de un 20%.

Cuadro 1

No. de Muestras	Técnica de planimetría	Técnica. Análisis de digitalizado Imagen
25	42%	32.4 %

Al comparar ambas técnicas

Se obtiene una diferencia de un 10% debido a que en la Técnica de planimetría al utilizar la plantilla no es tan exacta y puede variar dependiendo de la persona que realice la técnica en comparación el Análisis Digitalizado puede ser mas exacto en cuanto a la medición por que lo hace la computadora.

Los resultados completos se pueden observar en la tabla no 1

2. Prueba de Inmunofluorescencia

En la prueba de Inmunofluorescencia se observaron 25 laminillas de las cuales 11 resultaron sospechosas o positivas a *Mycoplasma hyopneumoniae*, en la figura (10) se puede observar la fluorescencia.

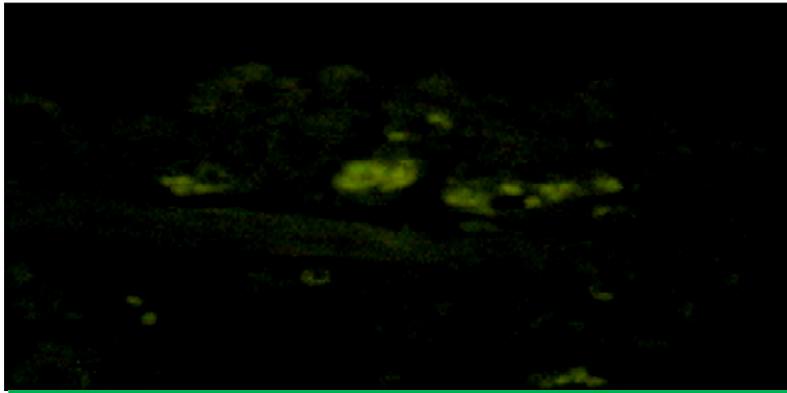


Fig. 10 a

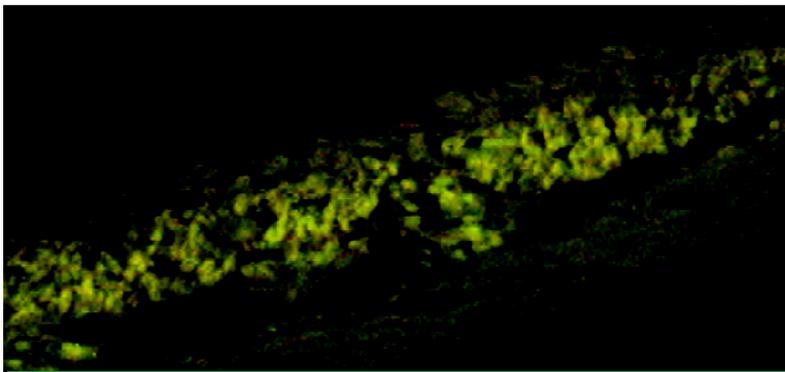


Fig. 10 b

En las figuras 10 a y b se muestra la positividad a la fluorescencia estas imágenes son de diferentes pulmones.

Nota: Los resultados completos se pueden observar en la tabla no 1

3. Aislamiento y Cultivo

Dentro del aislamiento y cultivo se pudo obtener el crecimiento de diferentes tipos de colonias tanto de morfología como de tamaño y sólo las colonias menores de 5mm se tomaron como sospechosas de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Como se puede observar en las siguientes imágenes.

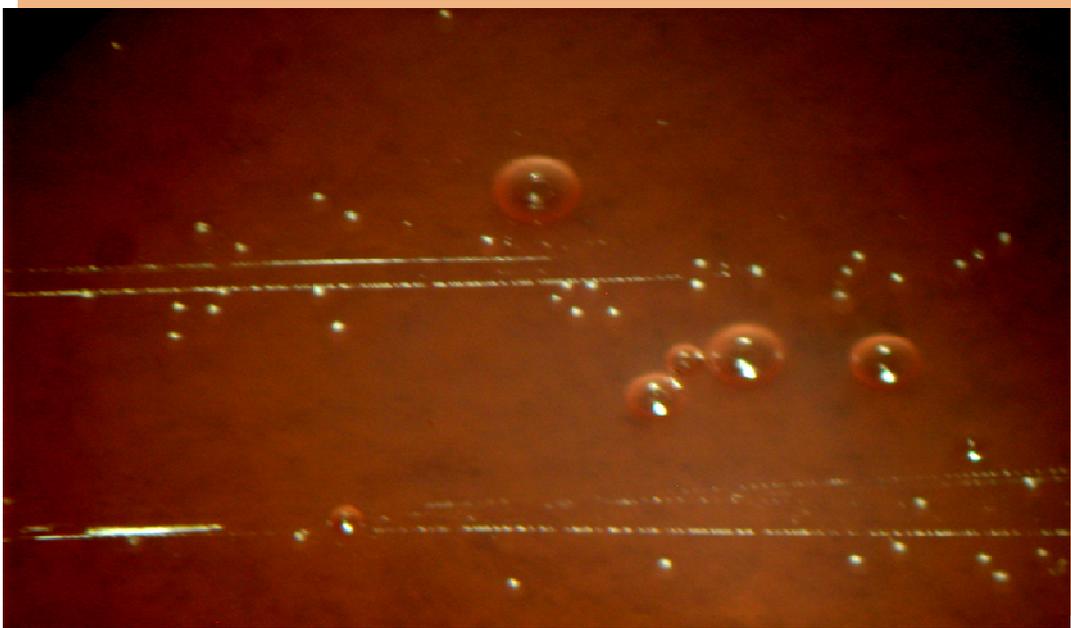


Fig. 11
Se puede observar colonias grandes las cuales son sugestivas de *Mycoplasma hyorhinis*



Fig. 12
En la figura se muestran las diferentes tipos de colonias tanto de tamaño y morfología, de las cuales las de menos de 5mm son sugestivas de *Mycoplasma Hyopneumoniae*.

4. Epifluorescencia

Estas mismas colonias fueron utilizadas para realizar la prueba de Epifluorescencia y poder comprobar de una manera rápida y efectiva que estas colonias se tratan de *Mycoplasma hyopneumoniae*, sin hacer las pruebas bioquímicas. Las imágenes fueron tomadas con microscopio óptico y de luz ultravioleta.



Fig. 13 (a)

Fig. 13 (a) Se observan colonias sospechosas de *Mycoplasma hyopneumoniae* observándose en microscopio óptico.



Fig 13 (b)

Fig. 13 (b) Se pudo observar la misma imagen pero con microscopio de fluorescencia, viendo la positividad en la imagen.



Fig. 14 (a)

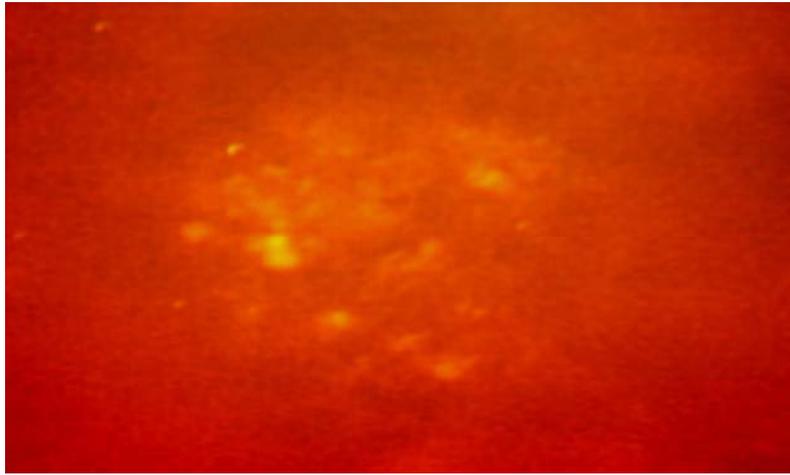


Fig.14 (b)

Fig. 14 (a) Se puede observar otra colonia diferente de la 13(a), tomado con microscopio óptico.

Fig. 14(b) Se muestra la misma colonia de la figura 13(a), con diferente tipo de filtro este es de color rojo, y al igual que la figura 13(b) se puede observar la fluorescencia positiva.

Los resultados completos se pueden observar en la tabla no 1

Tabla No. 1

Pruebas para el diagnostico de Neumonía Enzótica

No. De Muestra	Inmunofluorescencia	Cultivo	Epifluorescencia
1	Positivo	Negativo	Negativo
2	Positivo	Negativo	Negativo
3	Positivo	Negativo	Negativo
4	Negativo	Negativo	Negativo
5	Negativo	Negativo	Negativo
6	Negativo	Negativo	Negativo
7	Negativo	Negativo	Negativo
8	Negativo	Negativo	Negativo
9	Positivo	Positivo	Positivo
10	Positivo	Positivo	Positivo
11	Negativo	Negativo	Negativo
12	Negativa	Negativo	Negativo
13	Negativa	Negativo	Negativo
14	Negativa	Negativo	Negativo
15	Negativa	Negativo	Negativo
16	Positivo	Negativo	Negativo
17	Positivo	Negativo	Negativo
18	Positivo	Positivo	Positivo
19	Positivo	Positivo	Positivo
20	Positivo	Positivo	Positivo
21	Positivo	Positivo	Positivo
22	Positivo	Positivo	Positivo
23	Positivo	Positivo	Positivo
24	Negativo	Negativo	Negativo
25	Positivo	Positivo	Positivo

Cuadro resumen

No. Muestras	Prueba de Inmunofluorescencia	Cultivo y Aislamiento	Identificación de Mh por Epifluorescencia
25	56%	36%	36%

Se muestra en la tabla son los datos arrojados de las pruebas utilizadas para el diagnostico de Neumonía Enzótica (*Mycoplasma hyopneumoniae*).

Interpretación:

Estas pruebas son a nivel microscópico y se busca diagnosticar la presencia del agente causal de la Neumonía Enzótica.

En la prueba de Inmunofluorescencia se obtuvo un 56% de positividad porcentaje más alto al obtenido en la prueba de Aislamiento, Cultivo y Epifluorescencia debido a que varios factores involucrados afectan el resultado de la prueba.

Tabla no 2 Técnicas de apoyo para el Diagnóstico de Enfermedades respiratorias.

No. De Muestra	T. Planimetría	T. Análisis de Imagen
1	68 %	52%
2	50%	41 %
3	81 %	68 %
4	62 %	57 %
5	52 %	43 %
6	43 %	35 %
7	33 %	22%
8	67 %	56 %
9	73 %	40 %
10	10 %	5.6 %
11	13 %	3.3 %
12	32 %	29%
13	26 %	22 %
14	24 %	19%
15	28 %	15 %
16	36 %	30%
17	38 %	29%
18	27 %	21 %
19	33 %	25 %
20	54 %	47 %
21	53 %	48%
22	44 %	32 %
23	45 %	33 %
24	23 %	15%
25	35%	24%

Cuadro resumen

No. Muestras	Técnica Planimetría	Técnica Análisis Digitalizado de Imagen
25	42%	32.4%

Interpretación:

Al observar y revisar los datos obtenidos, se muestra que hay una diferencia de un 10 % entre ambas técnicas lo cual define la de Análisis de imágenes como la mas adecuada y exacta como técnica de apoyo para el diagnostico de afecciones respiratorias a nivel de campo.

6. DISCUSIÓN

Las formas de evaluación de lesiones pulmonares han sufrido cambios en los últimos años. En trabajos anteriores como lo es la Técnica de Planimetría, propuesta por el Doctor Abel Ciprián (2001), en dicha técnica se han podido apreciar algunas ventajas; se puede realizar en condiciones de campo, de manera rápida, sencilla y económica, sin embargo esta prueba presenta deficiencias de precisión debido a que cambia de acuerdo a la persona que realiza el estudio ya que se tiene diferentes perspectivas de la lesión ocasionando que esta no sea exacta y tenga errores en lo que se refiere al porcentaje de la misma. Aunado a esto el estado de los pulmones cuenta mucho pues no es lo mismo un pulmón congelado a uno fresco, las lesiones cambian a cada momento y los cambios pos-mortem enmascaran estas muy fácilmente, esta prueba es mejor realizarla inmediatamente después de la necropsia.

Por el contrario la Técnica de Análisis digitalizado de imagen es una técnica más avanzada que permite cuantificar de una manera más exacta las lesiones pulmonares a nivel macroscópico, en cuanto a esta se requiere tomar fotografías en las cuales se distinga de una manera nítida las lesiones de los pulmones que de preferencia deben ser tomadas siempre a la misma distancia y con la misma intensidad de luz, si se cuenta con un celular con cámara de 5 mega píxeles en ese momento se puede hacer, aunque esta técnica es más exacta y laboriosa, se requiere de un programa especial al cual la gente no tiene acceso fácilmente y se ha empleado solamente a nivel de investigación.

En este trabajo se encontró una diferencia del 20 % lo que nos indica que la técnica de Análisis es la más adecuada para la determinación del porcentaje de lesión pulmonar además de que ambas técnicas podemos decir que nos sirven como herramientas de apoyo para el diagnóstico de enfermedades respiratorias y en este caso de neumonía.

Ambas técnicas nos indican el porcentaje de lesión de los pulmones dañados pero no el agente que se encuentra involucrado

Otros autores (Giger y col; Schuller, y col; Amanfu) hablan de que se han desarrollado técnicas Inmunohistoquímicas para demostrar la presencia de *M. hyopneumoniae* como son la Inmunofluorescencia (IF) y la Inmunoperoxidasa indirecta. Estas técnicas se realizan sobre

cortes de tejido pulmonar (obtenidos del límite de la lesión neumónica e incluyendo bronquios cortados transversalmente) y son útiles en el diagnóstico de la fase aguda de la enfermedad, cuando existen grandes cantidades de micoplasmas en el pulmón; en lesiones crónicas, pese a obtenerse las muestras de lesiones neumónicas claras, no siempre se puede demostrar la presencia de *M. hyopneumoniae*, hecho que explicaría el descenso de micoplasmas a medida que el proceso se hace crónico.

Podemos decir en este trabajo en lo referente a la prueba de inmunofluorescencia es una técnica rápida pero laboriosa por el procesamiento de las muestras aproximadamente requiere 2 días para la obtención de resultados, es una prueba confiable y como todas tiene un margen de error. Para confirmar al agente que se está buscando, se realiza el cultivo del mismo. Se requiere de dos semanas aproximadamente para obtener los resultados y no siempre es exitosa ya que tiende a contaminarse fácilmente, El cultivo se realiza en medios complejos como los descritos por Friis y Goodwing. Su primer aislamiento sólo se consigue en medios líquidos como el de Friis en el que crece lentamente y las colonias en medio sólido se hacen visibles hacia los 2 días de incubación; esta prueba es indicada para aislar al agente que se cree está causando el problema en su granja o explotación.

Se realizó la prueba de Epifluorescencia igual de confiable y más rápida; (Cruz 2000) el día que se hace la prueba se obtienen los resultados; se hace de la caja en la cual se están observando las diferentes colonias de micoplasma.

Todas estas pruebas en conjunto nos dan un resultado más exacto y una idea de que agentes están interviniendo en la salud de los animales y así poder disminuirlo, a la vez conocer las diferentes técnicas que se pueden utilizar para el diagnóstico de la enfermedad.

Autores como (Calsamiglia y col) mencionan que existen otras pruebas para diagnosticar la enfermedad, como PCR que puede emplearse para identificar los microorganismos causantes de la enfermedad, es rápida pero no puede considerarse sustituta a la bacteriología clásica; detecta el DNA pero no distingue entre microorganismos vivos y muertos ni tampoco determina sensibilidad a los antibióticos; otra desventaja es la detección de falsos negativos además de que no es una prueba de rutina en laboratorios del país.

CONCLUSIONES

En este trabajo no se pretende comparar las técnicas y/o pruebas solo complementarlas y al mismo tiempo mejorar la calidad y rapidez del servicio de diagnóstico.

Cabe mencionar que en la Técnica de planimetría se obtuvo un 42% de lesión pulmonar y en la de Análisis un 32.4% dando una diferencia del 20% mostrando que la técnica de Análisis es mas adecuada debido a que la delimitación de las lesiones pulmonares se hace mediante un programa de cómputo y siempre se calcula de la misma manera, en cuanto a la técnica de planimetría puede variar dependiendo de la persona que la realice.

Además debemos decir que ambas técnicas solo se recomiendan como herramientas de apoyo para el diagnóstico de afecciones respiratorias a nivel de campo o en una explotación.

En cuanto a la Prueba de Inmunofluorescencia se obtuvo un 56% de positividad (14 laminillas positivas) a *Mycoplasma hyopneumoniae* al realizar el cultivo de estas solo 9 resultaron positivas esto quiere decir que en la prueba de Inmunofluorescencia hubo factores que intervinieron en la alteración de los resultados tales como exceso de colorante en la muestra, presencia de artefactos así como una posible reacción cruzada con algún otro agente por lo que se recomienda realizar la confirmación de los resultados con otras pruebas como lo es el cultivo y aislamiento que si bien son pruebas tardadas son confiable aunque laboriosas en el proceso.

En lo que respecta a la prueba de Epifluorescencia es rápida y confiable nos ahorra tiempo y se puede hacer directamente sobre la colonia sospechosa en el cultivo sólido.

BIBLIOGRAFIA:

1. Álvarez RM. Evaluación Comparativa de las lesiones pulmonares sospechosas de *Mycoplasma hyopneumoniae* mediante técnica de planimetría y análisis digital de imágenes. (Tesis de licenciatura). México: UNAM. 2004.
2. Bach HP, Baker JR. “Histochemical and Immunohistochemical Techniques”. 2ª ed. Editorial. Chapman & Hall. México. 1991.
3. Blood. D.C, Radostitis O. M, J. A Henderson “Medicina veterinaria”, Vol 1, 7ª edición. Edit. Interamericana Mc Graw- Hill. 1992.
4. Calsamiglia M. Unidad de Histología y Anatomía patológica. Departamento de Anatomía y Sanidad. Facultad Veterinaria. U.A de Barcelona. Bella Terra Barcelona; 2000.
5. Ciprián A, Mendoza S. “Memorias del curso de Enfermedades Respiratorias del cerdo”. Editorial. Fort Doge Animal health. México. 2001
6. Cruz ST.” Efecto de la infección experimental de *Mycoplasma hyopneumoniae* sobre la inmunidad celular en el pulmón de lechones” (Tesis de doctorado). México: UNAM, 2000.
7. Cruz ST, Romero RA. “Inmunología Veterinaria Aplicada”. 1ªedición. Editorial UNAM. México. 2001
8. Cruz ST. “Manual de laboratorio para el diagnóstico de neumonía enzoótica”. 1ª ed. Editorial. UNAM. México. 2004.
9. Cruz ST, Tórtora PJ, Vega AM. Cinética de la infección experimental con *Mycoplasma hyopneumoniae* usando inmunofluorescencia. Vet. México. , 34(1) 2003.

10. Ciprián A, Cruz T and Pijoan C. Specific fluorescence against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pneumonic lungs on pigs in México. Proceeding Int Pig. Vet Soc. Congress. México 1982.
11. Friis NF. Mycoplasmas cultivated from the respiratory tract of Danish pigs. *Vet Scand* 1971 a: 12; 116-119.
12. Hans P, Klaus B. "Manual de las enfermedades del cerdo". 2nd ed. España Editorial: Acribia S.A. 2001.
13. Hill RJ, Sainsbury D W. "The Health of pigs". Editorial. Longman Scientific & Technical. México 1995.
14. Morilla AG. "Manual para el control de las enfermedades infecciosas de los cerdos". 2ª ed. Editorial. Manual Moderno, México 2005. Pág. 77-88
15. Peter H, and John R.J. "Histochemical and Immunohistochemical techniques" Editorial. Chapman & Hall. 1991.
16. Rodríguez VR. "Enfermedades de importancia económica en producción animal". 1ª edición, editorial, Mc Graw Hill. México. 2005
17. Rodríguez S, Warnke Rouse; "Applied immunohistochemistry" Vol. 5 (1): 59-62 1997
Ro LH, Ross RF. Comparison of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains by serologic methods. *Vet Res* 1983;44; 2087-2094.
18. Switzer WP. Swine mycoplasmosis. *Annals of New York Academy of Sciences*. 1967:143,281-286.
19. Straw EB, D'Allaire S. "Enfermedades del cerdo". 8ª ed. Editorial. Intermedica. Argentina 2000. Pág. 334
Whittlestone P. Enzootic pneumonia of pigs (EPP). *Adv Vet Se Comp Med*. 1973; 17; 1-55 .

20. Whittlestone P. Pathogenic Mycoplasma CIBA Foundation Symposium. 1974; 263-283
21. Zimmerman JJ, Taylor DJ, Diseases of swine. 9^a. ed. Editorial Blackwell Publishig. 2006. Pag. 701-709

Consultas de Internet:

22. Archana C. "Mycoplasmas infection". 2007
Disponible en: <http://www.emedicine.com-ped-topic>.
23. Lobo E. Mycoplasma hyopneumoniae and its relation with the respiratory processes in swine.2005
Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>.
24. Sartk K. Risk factors for Respiratory Diseases en New Zeland pig Herds.2002
Disponible en: <http://www.epicentro.massey.ac.nz/taerk>
25. Fuentes M. "Entendiendo el complejo Respiratorio Porcino" Venezuela, 2000.
Disponible en: <http://www.e-campo.com/media/news/nl/ganporcinossanidad7.htm>
26. Goodwin RFW. Apparent reinfection of enzootic-pneumonia free pig herds: Search for possible causes. Vet. Rec. 1985; 116: 690-693.