



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL.

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“DESARROLLO DE UNA PRUEBA DE CO-AGLUTINACIÓN PARA
EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE *Mycoplasma hyopneumoniae*
EN CERDOS”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD Y DE LA PRODUCCIÓN ANIMAL.

PRESENTA:

LIDIA SERRANO JAIMES.

TUTOR PRINCIPAL

SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA.
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
Universidad Nacional Autónoma de México
Estado de México

COMITÉ TUTOR

HUMERTO RAMÍREZ MENDOZA
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Nacional Autónoma de México
México, D. F.

ROSA ELENA MIRANDA MORALES
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Nacional Autónoma de México
México, D. F.

Cuautitlán Izcalli, Estado de México. Octubre del 2014.





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.

ASESORES DE TESIS

Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira

Profesor Titular C
Línea de investigación: Microbiología, Enfermedades
Bacterianas y Virales de los cerdos
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
Universidad Nacional Autónoma de México
Estado de México

Dr. Humberto Ramírez Mendoza

Profesor Titular C. Tiempo Completo. Definitivo
Línea de Investigación: Enfermedades Virales
de los Animales Domésticos
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Nacional Autónoma de México
México, D. F.

Dra. Rosa Elena Miranda Morales

Profesor Asociado A. Tiempo Completo
Línea de Investigación: Micoplasmosis de los
Animales Domésticos
Facultad de Medicina Veterinaria y zootecnia
Universidad Nacional Autónoma de México
México, D.F.

CO ASESOR DE TESIS (INVITADO)

Dr. José Abel Ciprián Carrasco

Profesor Titular de Carrera C Definitivo
De Tiempo Completo
Línea de investigación: Microbiología, Enfermedades
Bacterianas y Virales de los cerdos
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
Universidad Nacional Autónoma de México
Estado de México

JURADO DE EXAMEN

Presidente: Dr. Víctor Rubén Tenorio Gutiérrez

Profesor Investigador
Línea de Investigación: Microbiología Animal
Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas
Y Pecuarias
México, D.F.

Secretario: Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira

Profesor Titular C
Línea de investigación: Microbiología, Enfermedades
Bacterianas y Virales de los cerdos
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
Universidad Nacional Autónoma de México
Estado de México

Vocal: M. en C. Laura Hernández Andrade

Profesor Investigador
Línea de Investigación: Microbiología Animal
Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas
Y Pecuarias
México, D.F.

Primer Suplente: Dr. Carlos Gerardo García Tovar

Profesor Titular A. Tiempo Completo
Línea de Investigación: Biología Celular, Morfología
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
Universidad Nacional Autónoma de México
Estado de México

Segundo Suplente: Dr. Gustavo García Delgado

Profesor Titular B de Tiempo Completo Definitivo
Línea de Investigación: Enfermedades Bacterianas y Micóticas
de los Animales Domésticos
Facultad de Medicina Veterinaria y zootecnia
Universidad Nacional Autónoma de México
México, D.F.

El presente trabajo fue realizado en:

Laboratorio 3 de Virología y Laboratorio 1 de Microbiología de las Enfermedades Respiratorias del Cerdo, del edificio de Posgrado de Campo 1, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, bajo la asesoría de la Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira y la co-asesoría del Dr. Abel Ciprián Carrasco.

Y con el apoyo económico:

Becaria de CONACYT número: 420877

Proyectos:

- 1.- PAPIIT: ITE 218711-3
- 2.- PIAPIC12

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres el Sr. Lorenzo Serrano Gutiérrez y la Sra. Gema Jaimes Mota:

GRACIAS por darme la vida, llenarme de amor y cariño, enseñarme a luchar por lo que quiero y a nunca rendirme. De ustedes he aprendido a nunca decir “no puedo” y luchar hasta lograr mis metas; la constancia, el esfuerzo y la dedicación a mi trabajo es lo que siempre me han inculcado. Para ustedes todo mi amor y cariño.

A mis hermanas Claudia Serrano Jaimes y Beatriz Adriana Serrano Jaimes:

Mis grandes amigas, confidentes y cómplices de travesuras, gracias por su amor, abrigo y comprensión, cada uno de sus consejos me han ayudado a crecer y ser mejor cada día, con todo mi amor y cariño.

A mis angelitos Antonio Uriel Serrano Jaimes, Ángeles Getsemaní García Serrano, Alitzel Sofía García Serrano:

Ustedes han llenado de alegría mi vida, al venir al mundo me dieron una razón más para luchar, no me canso de dar gracias a dios por darme la oportunidad de tener unos sobrinos tan maravillosos. A los tres los amo con todo mi corazón.

A ti amigo mío Andrés Alfonso Morales Gracida, gracias por estar conmigo en las buenas y en las malas, ser mi cómplice de aventuras, enseñarme a ser mejor persona día a día y por tus invaluable consejos. Sin ti no habría logrado esta meta. Te quiero mucho amigo.

A mis amigos y cómplices de travesías tanto en el laboratorio como en la vida, por permitirme el honor de su amistad, por enseñarme a ser mejor persona y mejor amiga, por guiarme y aconsejarme en los malos y buenos momentos.

Gracias a Dios por darme las fuerzas, entereza y la fe de que todo se puede solo es cuestión de paciencia y tiempo, y por permitirme la oportunidad de concluir una etapa más de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Laboratorio de Virología y Microbiología de las Enfermedades Respiratorias del Cerdo, por el apoyo brindado en cuanto a infraestructura, equipo y material necesario para concluir este trabajo de tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante estos dos años.

Al laboratorio AVIMEX S.A. de C. V., al M en C. Horacio Lara Puente por su enorme apoyo y aportación en cuanto al análisis y elaboración de algunas de las técnicas moleculares y serológicas usadas en este trabajo de investigación.

Al Laboratorio de Microscopia Electrónica de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, a la Dra. Sofía Gonzáles Gallardo, por su invaluable apoyo brindado en la parte experimental enfocada a Microscopia Electrónica de Transmisión.

Al Laboratorio de Química Medicinal, al Dr. Enrique Ángeles Anguiano, al Dr. Víctor Hugo Vázquez Valadez por su gran apoyo en la realización de la técnica de determinación de proteína y análisis de resultados.

A mi comité tutorial: Dr. Humberto Ramírez Mendoza, Dra. Rosa Elena Miranda Morales, por su guía y sus valiosos consejos durante cada una de mis evaluaciones tutorales.

A mis asesores de tesis Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira y Dr. Abel Ciprián Carrasco, por darme la oportunidad de trabajar con ustedes, brindarme sus

conocimientos y sobre todo su amistad; sin su apoyo, aliento y dedicación, este trabajo no hubiese sido logrado.

Al MVZ. Juan Edgardo Camacho Medina por su enorme apoyo y valiosa colaboración en cada etapa de la fase experimental de este proyecto de tesis, el logro también es de usted.

A todos y cada uno de los integrantes del Laboratorio de Microbiología y Virología de las Enfermedades Respiratorias del Cerdo y amigos: Dr. Eliseo Hernández Bumgarten, MVZ. David Trujillo Ceballos, p. Ing. Edgar Martínez Montoya, Ing. Fernando Sotres Carreras, M. en C. Nora Rosalía Flores Huitrón, M. en C. Paula D. Pardavé González, MVZ. María del Rosario Martínez Calles, MVZ. Elizabeth Aguirre García, MVZ. Omar Arturo Cuahutle Escamilla, QFB. Ariana Romero Flores, QFB. Belem Montoya Maya, M. en C. Alejandro Vargas Sánchez; por su invaluable apoyo en cada una de las fases del experimento, su amistad y ayuda.

RESUMEN

Se considera a *Mycoplasma hyopneumoniae* como el agente etiológico primario de la neumonía crónica porcina o Neumonía Enzoótica (NE); esta se caracteriza por una elevada morbilidad (hasta un 100%) y baja mortalidad (1.4 % en promedio), cerdos de todas las edades son susceptibles (principalmente animales menores de seis semanas de edad), la prevalencia es alta en animales en crecimiento y finalización media (entre 14 y 20 semanas de edad). Para su diagnóstico en campo, no existe una prueba sencilla y rápida que se esté aplicando, por ello en el presente trabajo se desarrolló una prueba de Co-aglutinación basada en la utilización de partículas de látex como facilitadores de la observación de la reacción antígeno-anticuerpo. Se estudiaron un total de 100 sueros procedentes de varias granjas los cuales se analizaron inicialmente con la técnica de ELISA de Bloqueo, posteriormente los resultados se compararon con los obtenidos en la técnica de Co-aglutinación, la prueba mostró una sensibilidad relativa del 59.46% y una especificidad relativa del 84.13%. Estos resultados muestran una sensibilidad relativa baja y una especificidad relativa baja para una prueba de diagnóstico, sin embargo, se hace necesario la utilización de otras pruebas más sensibles para poder establecer un diagnóstico de forma más precisa. Este trabajo propone una opción para el desarrollo de una prueba práctica y sencilla en el diagnóstico de la Neumonía Enzoótica a nivel de granjas.

Palabras clave: *Mycoplasma hyopneumoniae*, reacción de aglutinación, prueba de aglutinación, ELISA de bloqueo.

ABSTRACT

It is considered to *Mycoplasma hyopneumoniae* as the primary etiological agent of chronic swine pneumonia or enzootic pneumonia (NE); This is characterized by high morbidity (up to 100%) and low mortality (1.4% on average), pigs of all ages are susceptible (mainly animals under six weeks old), the prevalence is high in growing animals and completion average (between 14 and 20 weeks of age). For diagnosis in the field, there is no simple and rapid test that is being applied, therefore in this paper a test is developed based on Co-agglutination using latex particles as facilitators of observation antigen-antibody reaction; a total of 100 sera from various farms which are initially analyzed by ELISA Blocking then the results were compared with those obtained by the technique of Co-agglutination, the test showed a sensitivity of 59.46% relative studied and relative specificity of 84.13%. These results show a relatively low sensitivity and a relative low specificity for a diagnostic test, however, using more sensitive to establish a more accurate diagnostic tests are necessary. This paper presents a concept for the development of a simple and practical test in the diagnosis of enzootic pneumonia at the farm level.

Key Words: *Mycoplasma hyopneumoniae*, agglutination reaction, agglutination test, blocking ELISA.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
<i>Transmisión:</i>	5
<i>Patogénesis:</i>	6
<i>Lesiones:</i>	16
<i>Macroscópicas:</i>	16
<i>Microscópicas:</i>	17
<i>Inmunología:</i>	19
<i>Signos Clínicos:</i>	22
<i>Prevención, control y erradicación:</i>	23
<i>Diagnóstico:</i>	25
<i>Necropsia:</i>	27
<i>Histopatología:</i>	27
<i>Aislamiento:</i>	27
<i>Pruebas bioquímicas:</i>	30
<i>Epiimmunofluorescencia:</i>	32
<i>Inhibición metabólica e inhibición de crecimiento:</i>	32
<i>Anticuerpos fluorescentes o Inmunofluorescencia (IFA):</i>	33
<i>Inmunohistoquímica (IHC):</i>	34
<i>Pruebas de diagnóstico molecular:</i>	34
JUSTIFICACIÓN	45
HIPÓTESIS.....	46
OBJETIVOS.....	47
MATERIAL Y MÉTODO	48

RESULTADOS	62
DISCUSIÓN.....	70
CONCLUSIONES	75
REFERENCIAS	76

CUADROS Y DIAGRAMAS

Cuadro 1.	Principales métodos de diagnóstico para enfermedades que afectan a los cerdos.....	26
Cuadro 2.	Curva patrón de albúmina.....	55
Cuadro 3.	Diluciones de la muestra.....	55
Cuadro 4.	Componentes del reactivo de Bradford.....	56
Cuadro 5.	Resultados Prueba de ELISA	67
Cuadro 6	Resultados Prueba de Co-aglutinación	67
Cuadro 7	Análisis Prueba de Co-aglutinación.....	68
Diagrama1	Diseño de investigación.....	48

FIGURAS

Fig. 1.	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> adherido al epitelio ciliado. Diámetro aproximado 1 μm	4
Fig. 2.	Epitelio columnar ciliado de un bronquiolo, se observa un microorganismo compatible con <i>Mycoplasma</i> y una disminución en el número de cilios.....	7
Fig. 3.	Áreas de consolidación en lóbulos apicales derecho e izquierdo y lóbulo caudal derecho, con zonas de hepatización.....	17
Fig. 4.	Lesión ocasionada por <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> , pérdida de cilios y exfoliación.....	18
Fig. 5.	Hiperplasia linfoide en pulmón de cerdo.....	19
Fig. 6.	Técnica de tinción negativa y microscopio electrónico de transmisión.....	58
Fig. 7.	Colonias típicas de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> en diversos estadios de crecimiento.....	62
Fig. 8.	Cambios de coloración del medio líquido en distintas fases de crecimiento.....	62
Fig. 9.	Prueba de dependencia de esteroides. Formación del halo de inhibición.....	63
Fig. 10.	Partículas de látex y microorganismo compatible con <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	65
Fig. 11.	Comparación de la partícula de látex con el microorganismo compatible con <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	65
Fig. 12.	Unión partícula de látex y <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	66
Fig. 13.	Reacción de aglutinación observada por Microscopía Electrónica de Transmisión.....	66
Fig. 14.	Reacción de aglutinación.....	68
Fig. 15.	Reacción de aglutinación demostrada por Morton, 1966.....	73

ABREVIATURAS Y SIGLAS

°C: Grados centígrados.

ACF: Adyuvante Completo de Freund.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

AICF: Adyuvante Incompleto de Freund.

APC: Célula Presentadora del Antígeno.

ARN: Ácido Ribonucleico.

ATP: Trifosfato de Adenosina.

BCR: Receptor de Células B.

BSA: Albúmina Sérica Bovina.

CCU: Unidades Cambiantes de Color.

ELISA: Ensayo de Inmuno Adsorción Ligado a Enzimas.

FC: Fijación del Complemento.

G-C: Guanina- Citocina.

GMCSF'S: Factores Estimulantes de Colonias de Granulocitos y Monocitos.

HBSS: Solución Salina Buferada de Hank's.

IFA: Inmunofluorescencia.

Ig's: Inmunoglobulinas.

IHC: Inmunohistoquímica.

IL: Interleucinas.

IM: Intramuscular.

IN: Intranasal.

IP: Intraperitoneal.

IV: Intravenoso.

Kb: Kilobases.

KCL: Cloruro de Potasio.

kD: Kilodaltons.

km: kilómetros

LA: Aglutinación en Látex.

LAT: Aglutinación en Látex en Tubo.

LDH: Lactato Deshidrogenasa.

M. h.: *Mycoplasma hyopneumoniae*.

M.: *Mycoplasma*.

Mab: Anticuerpo Monoclonal.

MALT: Tejido Linfoide Asociado a Mucosas.

mg: miligramos.

MHC: Complejo Principal de Histocompatibilidad.

Min: minutos.

MIP: Proteína Inflamatoria de Macrófago.

ml: mililitros.

mm: milímetros.

NE: Neumonía Enzoótica.

Nf- κ B: Factor de transcripción células eucariotas.

ng: nanogramos.

NK: Natural Killers o Células Asesinas.

nm: nanómetros.

NMP: Neumonía Micoplasmática Porcina.

Novo: Nueva procedencia.

OD: Densidad Óptica.

OIE: Organización Internacional de Epizootias.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

PCV2: Circovirus Porcino 2.

PGE2: Prostaglandinas E2.

pH: Potencial de Hidrógeno.

PMN: Polimorfonucleares.

PPLO: Organismos Semejantes a los que provocan la Pleuroneumonía.

PRRS: Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino.

Psi: Libras por pulgada (unidad de presión del sistema métrico anglosajón)

ROS: Especies Reactivas al Oxígeno.

SC: Subcutáneo.

SJ: Cepa de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

SPF: Libres de Patógenos Específicos.

Std: Solución Stock o Patrón.

TCR: Receptor de Células T.

Th1, Th2: Linfocitos T cooperadores.

TLAB: Tejido Linfoide Asociado a Bronquios.

TNF: Factor de Necrosis Tumoral.

TRI: Inhibición de Tetrazolio.

TRL: Receptor Tipo Toll.

WB: Western Blot.

WBI: Inmunoensayo Western Blot.

μ : Micras.

μ g: Microgramos.

μ l: Microlitros.

μ m: micrómetros.

INTRODUCCIÓN

La micoplasmosis es uno de los problemas más graves que hasta el momento continúa afectando a la industria porcina. Ha ocasionado pérdidas económicas de hasta 200 millones de dólares por concepto de medicamentos, manejo adicional, reducción en el índice de crecimiento, eficiencia y conversión alimenticia. En Estados Unidos de Norteamérica, Funderburke (2001), citado por Bachmann (2004) y Salceda (2010), demostraron que la tasa de crecimiento en cerdos positivos a *Mycoplasma* disminuye en 38 gr/día, también que el animal que llega a la etapa de finalización con un 20% de lesiones pulmonares, puede perder hasta 25 Kg o más, disminuyendo así el precio de la canal. La infección por *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M.h.*) adiciona 6 a 15 días más para que el animal alcance el peso al mercado (Bachmann, 2004; Luciano *et al.* 2009; Salceda 2010).

En México, varios estudios reportan incidencias de 30 a 80% en animales sacrificados y revisados en rastro o granjas. Se ha informado que el 25% de los cerdos tienen anticuerpos contra *M.h.* entre las 10 y 12 semanas de edad, además de que aproximadamente el 90% de los cerdos son seropositivos en el momento de sacrificio (Cruz, 1991; Ameri *et al.*, 2006).

M.h. al interactuar con otros microorganismos como *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, *Actinomyces Pyogenes*, *Actinobacillus pleuroneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Bordetella bronchiseptica* y *Arcanobacterium pyogenes* ocasiona la llamada neumonía enzoótica por eso se reconoce como el agente etiológico primario; además, cuando interacciona con el Virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS), Influenza Porcina, Circovirus Porcino 2 (PCV-2), Citomegalovirus, Aujeszky y Coronavirus porcino (PRCV), se le reconoce como Complejo Respiratorio Porcino (CRP) (Thacker *et al.*, 2000).

La vía de transmisión principal es por contacto directo y los signos clínicos no son patognomónicos del microorganismo, dependen también de la asociación con otros microorganismos (León *et al.*, 2001; Ciprián *et al.* 2005; Torremorell *et al.*, 2006).

Para el diagnóstico es importante realizar la historia clínica, revisar los signos clínicos y determinar cambios macroscópicos y microscópicos a nivel del sistema respiratorio a la muerte del animal. Durante muchos años se ha considerado el cultivo y aislamiento como “la prueba de oro”, sin embargo, este método es laborioso y tardado; otras técnicas que han demostrado mejores resultados son las pruebas de identificación del antígeno (inmunohistoquímica, inmunofluorescencia), técnicas moleculares (PCR, hibridación *in situ*, tipificación molecular) y pruebas serológicas (ELISA, fijación del complemento, hemaglutinación indirecta y directa, aglutinación en tubo) (Friis, 1975; Strasser *et al.*, 1992; Djordjevic *et al.*, 1994; Whitford *et al.*, 1994; Cruz *et al.*, 2003; Abeledo *et al.*, 2005; Okada *et al.*, 2005; Zhi-Xin *et al.*, 2010).

La mayoría de estas técnicas son laboriosas y no pueden ser llevadas a cabo de forma práctica a nivel de campo; para poder desarrollar una técnica rápida, fácil y no tan costosa se ha considerado a la técnica de aglutinación como la mejor opción, sin embargo, en la porcicultura hasta el momento no se ha elaborado una prueba que cumpla con estas condiciones, sólo se reconoce una prueba similar a nivel de campo, pero se aplica en el área avícola (OIE, 2013).

REVISIÓN DE LITERATURA

Los *Mycoplasmas* más frecuentes encontrados en el cerdo son: *M.h.* (agente etiológico primario de la neumonía enzoótica); *M. hyorhinis* (asociado a las lesiones de la pleuresía, pericarditis y artritis); *M. hyosynoviae* (responsable de las lesiones articulares); *M. flocculare* (muy extendido en el tracto respiratorio sin poder patógeno aparente) (Salceda, 2010).

M.h. se aisló por primera vez en el año de 1965 por Mare y Switzer en los Estados Unidos, y Goodwin Pomeroy y Whittlestone en el Reino Unido, trabajando por separado lo lograron caracterizar dándole la denominación de *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Mycoplasma suis pneumoniae* respectivamente. Después se demostró que ambos agentes eran idénticos, aunque la Comisión Nacional de Nomenclatura para *Mycoplasmas* no ha decidido cuál de los dos nombres es el correcto, *M.h.* es el de uso más común (Pijoan, 2002; Bachmann, 2004).

Se considera al *M.h.* como el agente etiológico primario de la neumonía crónica porcina; conocida también como Neumonía Micoplasmática Porcina (NMP) o Neumonía Enzoótica (NE), tiene un diámetro aproximado de 0.2 μm de diámetro, aunque otros autores reportan 0.3-1.0 μm (Figura. 1). Está rodeado por una membrana simple de 10 nm de grosor, en cuya superficie externa se encuentra una cápsula compuesta por polisacáridos; ultraestructuralmente también se observa una capa compacta de proteínas quienes le confieren una porción hidrófoba para favorecer su adherencia a las células respiratorias y una capa más externa compuesta por carbohidratos, además de un citoplasma que contiene ribosomas, gránulos citoplasmáticos y un núcleo procariótico característico constituido por moléculas circulares de ADN y moléculas de ARN, cuenta con un genoma de 800-900 Kb (5×10^8 Daltons) (Ross, 1984; Clark, 1999; Andrada *et al.*, 2003; Bachmann, 2004; Ciprián *et al.* 2005).

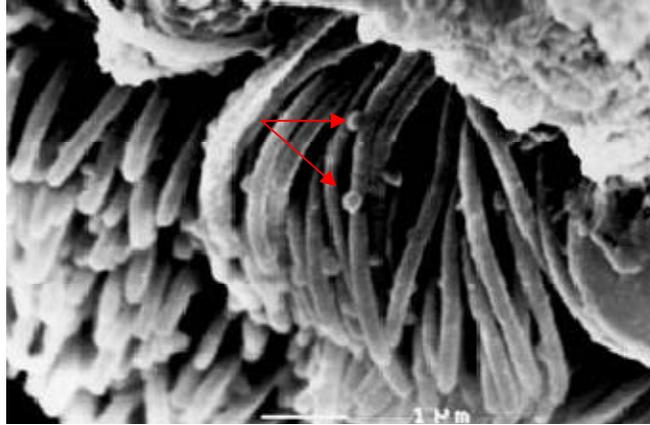


Figura 1. *Mycoplasma hyopneumoniae* (flechas rojas) adherido al epitelio ciliado.
Diámetro aproximado 1 μm.
(Tomado de: Luciano *et al.*, 2009)

Este microorganismo resiste 30 min a 45° C, pero a 50 °C se destruye en 5 min. Soporta la liofilización y temperaturas de -180° C. Desaparece del pelo y ropa en 48 horas en ambiente seco. Puede sobrevivir durante mucho tiempo en medio líquido idóneo, pero no cuando el cultivo se queda seco. No sobrevive a la desecación más allá de una semana, aunque esté en un medio favorable. Sobrevive bien en el agua de lluvia, hasta 17 días, a bajas temperaturas (2-7 °C) hasta por 31 días, lo que explicaría la transmisión aerógena por aire húmedo (Andrada *et al.*, 2003; Bachmann, 2004; Salceda 2010).

La neumonía aparece en función de varios factores como: su largo periodo de incubación, cantidad de microorganismos infectantes, patogenicidad y virulencia de estos, respuesta inmune del hospedero, lenta diseminación en la camada, manejo, la introducción de animales de diferentes procedencias, el flujo continuo, alta densidad poblacional, medio ambiente, fluctuaciones de temperatura, inadecuada ventilación, humedad excesiva, altos niveles de amonio y polvo fecal, y la propagación de otros agentes patógenos (Aldaz, 2002; Bachmann, 2004).

Transmisión:

La infección se origina normalmente cuando los lechones que poseen anticuerpos maternos son trasladados a las naves de engorde después del destete. Así, los lechones pasan inicialmente protegidos a estas naves, pero al disminuir la protección conferida por la madre, quedan expuestos a los aerosoles contaminados con *M.h.* procedente de los animales de mayor edad que permanecen en la nave (transmisión horizontal) (Andrada *et al.*, 2003).

La mayoría de autores coinciden en que el contacto directo es la vía más frecuente de transmisión, y también que la velocidad de propagación es lenta. Otros de los métodos de transmisión es el de las cerdas a sus lechones (Transmisión vertical), a través de fómites (menos probable) y la transmisión aérea (León *et al.*, 2001; Torremorell *et al.*, 2006).

La infección transmitida por vía aérea es difícil de evitar en las granjas libres de Neumonía enzoótica. Se han descrito brotes de menos de 3-3.2 km de distancia. La infección puede permanecer subclínica si no tienen lugar infecciones secundarias de importancia. Los factores ambientales generales en consideración son el tamaño de la granja y la densidad de la población porcina. Una vez que la pira se ha infectado con *M.h.*, la infección se volverá enzoótica, aunque los signos clínicos variarán dependiendo del manejo de la pira, la concentración de cerdos, el empleo de antibióticos, las infecciones secundarias (Andrada *et al.*, 2003; Luciano *et al.*, 2009; Sibila *et al.* 2009).

Stark *et al.*, (1998), demostró que *M.h.* se puede aislar a partir de muestras de aire obtenidas de los corrales de animales infectados con neumonía, lo que sugiere que el agente es capaz de difundir a través de ellos (Stark *et al.*, 1998; León *et al.*, 2001).

Patogénesis:

El epitelio del tracto respiratorio juega un papel importante en el control y eliminación de microorganismos. El depósito de partículas en el árbol respiratorio depende fundamentalmente de su tamaño, partículas de más de 10 μ se depositan en las conchas nasales por fuerza de inercia; al descender por el árbol respiratorio la velocidad del flujo de aire disminuye, lo que obliga a la sedimentación por gravedad de las partículas de 10 a 2 μ en el epitelio traqueo-bronquial, las partículas de menos de 0.5 μ no se depositan y se retiran con la expiración. Son entonces las partículas con diámetros de 0.2 a 5 μ las que no se depositan y logran llegar a la pared alveolar. La eficiencia en el despeje mecánico de partículas del epitelio traqueobronquial y el alveolo es marcada: mientras que el epitelio ciliado logra retirar el 90% de las partículas depositadas en menos de una hora, el alveolo sólo puede retirar el 50% en cuestión de horas y el resto puede tardar meses o no ser retirado (Pijoan, 2002).

El proceso de virulencia y patogenicidad que emplean los *Mycoplasmas* es muy complejo, involucra la unión, colonización, citotoxicidad, competición por el sustrato, evasión y modulación de la respuesta inmune del huésped (Figura. 2). El periodo de incubación fluctúa entre 7-16 días, periodo en el cual las lesiones pulmonares ya son evidentes (algunos autores mencionan hasta 4-6 semanas), sin embargo, el tiempo desde la primera entrada del microorganismo a una piara hasta la primera presentación de los signos clínicos puede variar de los seis ó hasta cuarenta y ocho meses (Kobisch and Friis, 1996; Bachmann, 2004; Salceda 2010).

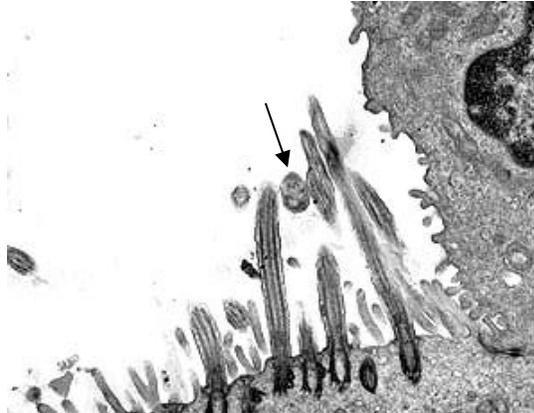


Figura 2. Epitelio columnar ciliado de un bronquiolo, se observa un microorganismo compatible con *Mycoplasma* (flecha) y una disminución en el número de cilios. 11500x (Tomado de: Sarradell, 2001).

Algunos *Mycoplasmas* profundizan hasta los alvéolos, *M.h.* no penetra el epitelio de las vías aéreas, se sitúa en el ápice de los cilios o en el espacio interciliar. La estructura de la membrana de *M.h.* le confiere la capacidad de unirse al epitelio del tracto respiratorio (el grado de adherencia determina la patogenicidad: el daño celular y la ciliostasis se produce sólo cuando se adhiere a las células); está conformada por dos tercios de proteínas y un tercio de lípidos. A diferencia de las membranas bacterianas, la membrana micoplasmática contiene colesterol y carece de ácido diaminopimélico. En su mayoría, encontraremos fosfolípidos y glucolípidos, que junto a las proteínas constituyen los determinantes antigénicos más importantes (Sarradell, 2001).

La unión de este microorganismo a las membranas celulares ocurre mediante la acción de algunas de estas estructuras proteínicas, que son un grupo de fosfoproteínas de reconocimiento y unión a receptores celulares que se polimerizan, formando estructuras fibrilares que se extienden lateralmente hacia el centro de la célula microbiana (Fernández, 2012).

La interacción entre estas estructuras proteínicas y las células respiratorias se explica porque se producen una serie de interacciones de tipo hidrofóbicas, siendo las proteínas en la capa intermedia del *Mycoplasma* quienes le confieren parte de la hidrofobicidad (Salceda, 2010).

Se han tratado de identificar las proteínas involucradas en este proceso, algunas de ellas son: p46, p65 y p74 que son proteínas de membrana, el factor citopático p54, la proteína PR2 que participa en las funciones de transporte y unión a ATP, la proteína de membrana 97kD, llamada p97, que es una de las más importantes en la adherencia ciliar, es la primera en ser detectada a partir de los 35 días post infección, además de que la variabilidad antigénica de esta adhesina puede ser uno de los mecanismos patogénicos utilizado por este agente para evadir el sistema inmunitario. El sitio de unión del *M.h.* está localizado en la secuencia repetida de la proteína de membrana p97 llamada región R1. La proteína accesoria a p97, p102, interviene también en el mecanismo de adhesión junto con p110 (Cruz, 1991; Zhang *et al.* 1995; Subramaniam *et al.*, 2000; Vicca *et al.*, 2003; Luciano *et al.*, 2009).

Algunos estudios indican que los cilios del epitelio del tracto respiratorio porcino pueden tener receptores para *M.h.*, estos receptores se reconocen como glicoconjugados; Zhang (1995), identificó a estos glicoconjugados y los denominó Lc (identificada en el total de lípidos extraídos de los cilios) y los glicolípidos sulfatados La y Lb (que tenían una unión más débil).

Otro de los procesos patológicos que ocasiona la adhesión de *Mycoplasma* es la exfoliación y destrucción del epitelio ciliado (cilio estasis), que son el resultado de la despolarización de la membrana celular a causa del trastorno de los canales de potasio en las células hospederas y del incremento y consecuente liberación de calcio del medio intracelular, específicamente del retículo endoplásmico, una vez perdida la primera barrera de defensa se adhieren otros microorganismos,

resultando en el incremento de la susceptibilidad a infecciones secundarias, ya sean virales o bacterianas (Bachmann, 2004).

La perturbación de la función celular a través de la membrana es probablemente un importante mecanismo de citotoxicidad causado por este agente. Aparentemente *M.h.* no secreta una sustancia citotóxica capaz de difundirse a través del epitelio ciliado *in vitro*. No se sabe específicamente qué causa efectos citopatológicos, puede ser que una toxina sea producida e induzca infiltración linfocítica peribronquial, se den cambios a la afinidad por la lecitina del epitelio bronquial o alteraciones histoquímicas de las células secretoras de *mucus* en porcinos infectados. La célula hospedera es vulnerable a materiales tóxicos liberados por este agente una vez adherido. Aunque la producción de toxinas no ha sido asociada a *Mycoplasma*, está bien establecido que diversas especies de *Mycoplasmas* producen metabolitos citotóxicos y poseen una actividad de enzimas citolíticas que pueden dañar a las células hospederas (Pijoan, 2002; Bachmann, 2004).

DeBey (1994) demostró que pasajes *in vitro* de este agente disminuyen significativamente su potencial citotóxico en cultivos traqueales en porcinos recién nacidos. Se necesitan 105 UCC (Unidades Cambiantes de Color) de organismos para inducir una citotoxicidad significativa 6 días post infección. También mostró que la pérdida de cilios se ve retrasada cuando el número de *Mycoplasmas* presentes en el inóculo es insuficiente y que la adherencia o al menos la asociación cercana al epitelio ciliado es necesaria para inducir la cilio estasis, esto resulta de la hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana del epitelio ciliar por potentes fosfolipasas presentes en la membrana celular del *Mycoplasma* (Bachmann, 2004).

En las otras especies de *Mycoplasmas* al unirse a las células del hospedero, los componentes citosólicos del microorganismo son descargados en el interior de la

misma, algunos de estos componentes son enzimas hidrolíticas que atacan y degradan los componentes celulares. Las más notables son las nucleasas que hidrolizan rápidamente los ácidos nucleicos celulares, liberando los precursores requeridos para la replicación y síntesis de los mismos en la célula microbiana. También los efectos citopáticos están dados por una vacuolización y reorganización del citoesqueleto, causado por la internalización y multiplicación en el citosol u organelos celulares de los *Mycoplasmas*. Esta vacuolización puede estar dada por la producción de peróxidos orgánicos (no producido por *M.h.*), puesto que algunos agentes antioxidantes como el α -tocoferol evitan la aparición de este efecto citopático (Fernández, 2012).

Se ha demostrado que existe una competencia por el consumo de nutrientes o precursores biosintéticos entre *Mycoplasma* y las células de epitelio respiratorio. Esto se debe principalmente a que consta de un genoma muy pequeño (800-900 Kb) y pobre en G-C (Guanina-Citocina). En su molécula de DNA de doble cadena y circular existen muy pocos genes (500), esto conlleva a la falta de algunas actividades enzimáticas y rutas metabólicas. No poseen citocromos o el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, a excepción de la actividad malato deshidrogenasa, carecen de genes que codifican para precursores de ácidos nucleicos y no sintetizan purinas y pirimidinas *de novo* (nueva procedencia) (Ramos, 2011; Lluch, 2010).

El *Mycoplasma* es extremadamente hábil para sobrevivir en hospederos de diferentes especies. Un mecanismo por el cual sobrevive es el cambio de dirección de la respuesta inmune a una menos efectiva (papel inmunosupresor). El mecanismo por el cual induce la enfermedad y cambia la respuesta inmune es desconocido. El sistema inmune está íntimamente involucrado en la neumonía por *Mycoplasma*, esto lo evidencia la agregación de linfocitos y monocitos en el tejido pulmonar (Bachmann, 2004; Salceda, 2010).

Los *Mycoplasmas* evaden la respuesta inmune al variar la expresión de las proteínas de superficie a nivel genético. Esto es consumado por el encendido o apagado de genes, o por el cambio en el tamaño de la superficie de las proteínas a través de la adición o sustracción de secuencias genéticas repetidas. Existe evidencia de que este tipo de alteración genética de las proteínas de superficie se da en el *M.h.* (Sarradell, 2001; Bachmann, 2004).

Se ha demostrado en estudios *in vitro* que los *Mycoplasmas* patógenos pueden adherirse a macrófagos y neutrófilos, no siendo fagocitados en ausencia de anticuerpos específicos. La capacidad de digestión de los *Mycoplasmas* por parte de los macrófagos y los neutrófilos también es menor que para el resto de las bacterias. Esto se debe a que la membrana de estos microorganismos es muy rica en lípidos, lo que impide una digestión efectiva. Por esta razón, parte de la membrana que no ha sido digerida puede ser expulsada al exterior de los neutrófilos y macrófagos junto a enzimas hidrolíticas, lo que provoca una digestión heterolítica del tejido pulmonar adyacente (Sarradell, 2001).

Al existir una asociación con el virus PRRS, la función de los macrófagos se ve afectada también, ya que este virus se caracteriza por reducir la capacidad de los macrófagos alveolares pulmonares para fagocitar y destruir bacterias, además de que también reduce la capacidad de los macrófagos intravasculares para eliminar bacterias de la sangre. Se ha demostrado también que los lípidos asociados a la membrana de *M.h.* inducen la producción de especies reactivas al oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO) en las células (macrófagos), los cuales llevan a la activación de la caspasa-3 quien se encarga de iniciar con el proceso de apoptosis de los macrófagos alveolares porcinos (Aldaz, 2002; Bai *et al.*, 2013).

El NF- κ B (Factor de transcripción de las células del huésped) también influye sobre las células inmunológicas regulando o modulando la muerte celular programada de las mismas de dos formas diferentes: por inhibición de la apoptosis

o aceleración de la misma. La inducción prematura de la apoptosis de un gran número de células durante la infección primaria de los *Mycoplasmas*, contribuye de manera significativa a la expansión y diseminación del microorganismo en el tejido parasitado (Rottem, 2003; Wu *et al.*, 2008; Fernández, 2012).

Los *Mycoplasmas* pueden presentar antígenos comunes a las células del hospedador (por un fenómeno de adsorción de material de la superficie celular o por síntesis del mismo). Mediante este mecanismo, puede eludir la respuesta inmune (Sarradell, 2001).

Aunque burle la fagocitosis, interactúa con polimorfonucleares (PMN) y células mononucleares, suprimiéndolas o estimulándolas a través del efecto de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-18), quimioquinas (proteína 1 quimio-atrayente de monocitos (MCP-1), proteína 1 α / β inflamatoria de macrófago (MIP-1 α / β), factores estimulantes de colonias de granulocitos y monocitos (GMCSFs)), prostaglandinas y metabolitos activos de oxígeno y nitrógeno. Los agentes desencadenantes de este mecanismo son las lipoproteínas de la membrana plasmática microbiana, estas lipoproteínas se unen a los receptores tipo Toll (TRL del inglés Toll-like Receptors) de la célula huésped, que traducen la señal y activan la expresión del factor de transcripción NF- κ B, el cual tiene sitios de unión en la región 5' de los genes que codifican para citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-6), induciendo la transcripción de los mismos. Estas modulinas reclutan hacia el sitio de infección primaria una gran cantidad de neutrófilos, causando la infiltración e inflamación del tejido, contribuyendo a la patogénesis de la enfermedad y al daño tisular, ocasionado por la infección (Thacker *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2008; Fernández, 2012; Bai *et al.*, 2013).

Estudios realizados por Choi *et al.*, (2006) revelaron diferencias significativas entre la IL-1, TNF- α e IL-6 en cerdos infectados experimentalmente con *M.h.* y cerdos libres de este microorganismo. Demostraron que las IL-1 aumentaron de

los 14 al 21 días post infección, pero había disminuido a los 35 días post infección; el TNF- α aumentó de 7 a 21 días post infección, pero había disminuido al día 35 post infección y que las IL-6 aumentaron a los 7 a 21 días post infección, pero habían disminuido al día 28 post infección. Los resultados sugieren que estas citocinas juegan un papel en la acumulación de células inflamatorias y que estas células también podrían participar en el desarrollo de las lesiones. Un factor importante a considerar es que se ha demostrado que este microorganismo tiene afinidad por los macrófagos alveolares, al infectarlos los induce a la producción y reclutamiento de la IL-1, IL-6 y TNF- α , por lo tanto, la sobreproducción de estas citocinas en el pulmón pueden exacerbar el efecto de *M.h.* (Choi *et al.*, 2006).

La mayoría de estas citocinas son proinflamatorias, pero algunas participan también en la regulación de la respuesta inmune, la IL-6 actúa como molécula antiinflamatoria inhibiendo la expresión de citocinas inflamatorias como el TNF- α y IL-1; la IL-8 se ha informado que tienen un efecto supresor en los neutrófilos y la IL-10 producida por las células T y los macrófagos activados, es un potente inhibidor de la función de los macrófagos, esto se asocia a la reducción significativa de las lesiones pulmonares en la neumonía (Lorenzo *et al.*, 2006).

Las potentes moléculas y los mediadores liberados por estas células incrementan la expresión del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) tipo I y II, además de que el TNF- α induce la llegada y extravasación de leucocitos en el lugar de infección y causan el daño local del tejido (Luciano *et al.*, 2009).

Diferentes especies de *Mycoplasmas* han demostrado estimular linfocitos T y B de manera no específica a través de la inducción de la síntesis de citocinas (IL-2, IL-4 e INF- α) este proceso se conoce como inflamación inducida por *M. h.* Estas citocinas ejercen efectos amplificadores en células fagocitas y linfocitos, afectando el balance entre las poblaciones de linfocitos T CD4+ Th1 y Th2, influenciando de esta manera la dirección de la fase efectora subsiguiente de la respuesta inmune e

incrementando la actividad de las células asesinas (NK). Esto trae como resultado cambios tisulares del sistema respiratorio, interferencia con sus mecanismos de defensa como la producción de sustancia bactericida, y cambios en los cilios (Bachmann, 2004).

Otro mecanismo utilizado por este microorganismo es el aumento de Prostaglandina E2 (PGE2), la cual se ha encontrado en los lavados bronquiales de pulmones de cerdos infectados, esta hormona se ha demostrado reduce la actividad microbicida de los PMN (Sarradell, 2001).

Estos microorganismos son considerados superantígenos, siendo capaces de activar una gran parte de la población de linfocitos T periféricos sin necesidad de llevarse a cabo el procesamiento del antígeno por las células presentadoras de antígenos (APC del inglés Antigen Presenting Cell). Esta activación es mediada sólo por el complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC II del inglés Major Histocompatibility Complex Class II) y la región variable de la cadena β del Receptor de Células T (TCR del inglés T Cell Receptor). La activación no específica de los linfocitos podría interferir con los mecanismos de regulación inmune y causar que estos mecanismos no funcionen de manera eficiente. Se cree que el mitógeno está ubicado en la membrana de *Mycoplasma* y es una proteína, posiblemente con un hidrato de carbono (Howard y Taylor, 1985; Rottem, 2003; Waites *et al.*, 2005; Fernández, 2012).

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, que es, probablemente, menos efectiva en controlar y eliminar el microorganismo (Abeledo *et al.*, 2005; Luciano *et al.*, 2009).

En recientes investigaciones se han encontrado que los macrófagos infectados con *Mycoplasma* son destruidos y que se presentan niveles elevados de IL-10 e

IL-12 citocinas que limitan la respuesta inmune celular específica y local, por eso se dice que ejerce un efecto inmunosupresor a nivel celular y humoral (Thanawongnuwech y Thacker, 2003).

Se han identificado anticuerpos contra las glucoproteínas de membrana de los eritrocitos del cerdo, lo que apoya la presencia de una enfermedad autoinmunitaria (Ciprián *et al.*, 2005).

La activación del sistema del complemento puede inducir la lisis del *Mycoplasma* a través de la cascada del complemento sobre la membrana del mismo. Puede activar la vía clásica del complemento en ausencia de anticuerpos detectables, lo que provoca la liberación de las anafilotoxinas C3a y C5a, mediadores químicos inflamatorios, que actúan simultáneamente como activadores de la coagulación. El conjunto de la activación de estos factores parece establecer el inicio del proceso inflamatorio a nivel pulmonar en la enfermedad natural. Se piensa que la activación del sistema de coagulación se debe al daño producido por el *Mycoplasma* sobre las células endoteliales de forma directa, este daño endotelial expone el colágeno subendotelial al contacto con los factores de la coagulación, activándose entonces la vía intrínseca de este sistema (Sarradell, 2001).

La producción de proteasas por los *Mycoplasmas*, tiene un papel fundamental en el proceso de colonización y persistencia de la enfermedad, mediante la evasión de la respuesta inmune mucosal. La principal enzima de este tipo es la IgA1-proteasa, una serina proteasa, que hidroliza a la IgA de las mucosas, lo que constituye una forma de evitar la eliminación de los microorganismos por opsonización (Fernández, 2012).

Estudios hechos por Le Carrou *et al.*, (2006) y Marois *et al.*, (2007), demostraron que a pesar de que *M.h.* se suele considerar un patógeno respiratorio, el aislamiento de este agente también es posible de hígado, bazo, riñones y

ganglios linfáticos de forma experimental, sin embargo, la difusión en otros órganos, parece ser transitoria y probablemente no participa en el desarrollo de la neumonía enzoótica (Le Carrou *et al.*, 2006; Marois *et al.*, 2007).

Tradicionalmente se había creído que los virus son primarios y que las bacterias aprovechan las alteraciones que éstos provocan en las células epiteliales y en los sistemas de defensa del tracto respiratorio. Pero no siempre es así. En el caso de la interacción entre dos de los patógenos respiratorios más frecuentes del cerdo, como son *M.h.* y el virus PRRS, ocurre justo lo contrario. *M.h.*, incluso en pequeñas cantidades, hace que la neumonía que produce el virus PRRS sea más extensa y duradera (Aldaz, 2002).

Lesiones:

Macroscópicas:

Consisten en una bronconeumonía catarral y se encuentran localizadas en las porciones ventrales del lóbulo apical y cardíaco, lóbulo accesorio y la porción craneal de los lóbulos caudales. Se observan áreas de consolidación pulmonar violácea a grisáceas en la parte ventral de los lóbulos apical y cardíaco, lóbulo intermedio, y la porción anterior de los lóbulos diafragmáticos (Figura. 3). En ausencia de infecciones secundarias, las lesiones tienden a ser focales y bien demarcadas. Al corte la consistencia es carnosa, pero no excesivamente firme. La superficie afectada presenta zonas de depresión comparada con el área no afectada. El pulmón derecho resulta siempre más afectado que el izquierdo al tener una distribución broncogénica más abundante (bronquio traqueal) (Blanchard *et al.*, 1992; Blood y Radostis, 1992; Calsamiglia y Pijoan ,2000).



Figura 3. Áreas de consolidación en los lóbulos apicales derecho e izquierdo y lóbulo caudal derecho con zonas de hepatización (Tomado de: Salceda, 2010).

En estados iniciales o intermedios de la enfermedad se observa un exudado catarral en las vías respiratorias. Los linfonódulos mediastínicos y bronquiales se encuentran agrandados. La consolidación regresiona 60 a 100 días post infección. Todas las especies de *Mycoplasmas*, y en particular *M.h.*, son la causa más frecuente de pericarditis fibrinosa en porcinos sacrificados en canal. El pico de severidad de las lesiones pulmonares está asociado al momento de la seroconversión (Bachmann, 2004).

Microscópicas:

Las lesiones histológicas en estado agudo de la enfermedad se caracterizan por la pérdida de cilios, exfoliación de las células ciliadas (Figura. 4) y una pequeña acumulación de neutrófilos en la superficie luminal del tracto respiratorio, así como en los alvéolos (Figura 5). En el estado intermedio se incrementa el número de linfocitos en la zona peribronquial, peribronquiolar y espacio perivascular, los alvéolos pueden contener fluido edematoso eosinofílico, células polimorfonucleares y mononucleares. Las glándulas bronquiales se hipertrofian, hay inflamación y congestión de capilares de los tabiques alveolares, presencia de exudado de células mononucleares en vías respiratorias. Las células epiteliales alveolares de tipo II sufren una hiperplasia progresiva a medida que empeora la enfermedad. En estados crónicos se observa una hiperplasia linforreticular,

peribronquial y perivascular, así como el adelgazamiento del septo interalveolar. En estados de convalecencia se observa colapso alveolar, enfisema y se puede observar una intensa hiperplasia linfonodular. Se observa neumonía intersticial y las vías respiratorias llenas de detritus celular. La hiperplasia linfoide y la acumulación mononuclear en la lámina propia, es una característica histológica dominante de la lesión pulmonar inducida por *M.h.*, lo cual provoca obliteración de la luz bronquial, lo que a su vez causa una disminución en la resistencia inspiratoria y espiratoria. Por lo que, los cerdos afectados tosen persistentemente, muestran respiración forzada y una disminución de la tolerancia al ejercicio (Bachmann, 2004; Salceda, 2010).

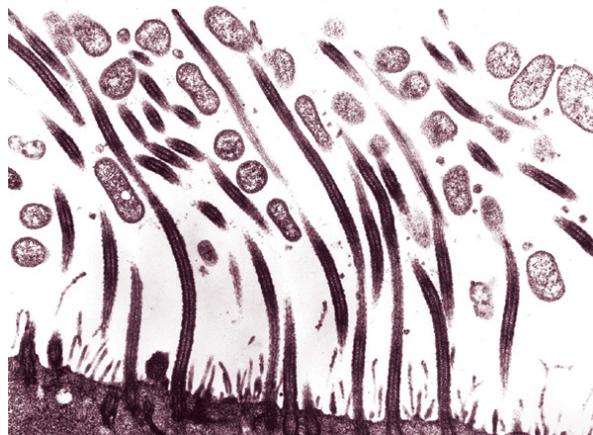


Figura 4. Lesión ocasionada por *Mycoplasma hyopneumoniae*, pérdida de cilios y exfoliación (Tomado de: Bentley *et al.*, 2005).

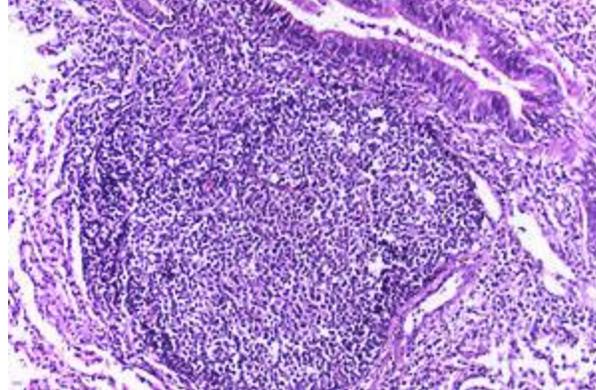


Figura 5. Hiperplasia linfoide en pulmón de cerdo.
(Tomado de: Sarradell, 2001).

Inmunología:

La dinámica inmunológica que sigue este microorganismo se inicia con la inhalación del aerosol infectado, éste alcanza la base de las células ciliadas y procede a adherirse, provoca el reclutamiento de linfocitos, monocitos, macrófagos en el punto de la infección mediante quimiotaxis de estas células. De esta manera, se inicia el foco inflamatorio. Las lipoproteínas de la membrana celular activan e inducen de forma directa la producción de citocinas (TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18 e interferón) a partir de los leucocitos de la sangre periférica, células de los epitelios respiratorios, monocitos, macrófagos y de los neumocitos tipo II de los alvéolos pulmonares, que modulan la actividad inflamatoria a nivel local. Este proceso da lugar a un exudado compuesto por linfocitos activados que proliferan intensamente, dando lugar a la formación de un infiltrado celular inflamatorio local. Dentro del infiltrado linfocitario, los *Mycoplasmas* opsonizados por el complemento y los anticuerpos son posteriormente fagocitados por los macrófagos activados, limitándose el crecimiento del microorganismo. Las citocinas IL-8 e IL-18 desempeñan un papel crucial en el desarrollo de la neumonía y se relacionan directamente con la gravedad de la enfermedad. La citocina IL-8, funciona como un activador de neutrófilos y la IL-18, funciona como un activador de células T con

la consiguiente producción de la cascada de citocinas de los dos tipos de células Th-1 y Th-2. El predominio de una respuesta inflamatoria del tipo Th-2 y sus citocinas correspondientes (IL-4, IL-5) en las vías respiratorias puede contribuir a la patogénesis y al mantenimiento de una inflamación e hiperreactividad crónica de las vías respiratorias. La producción local de citocinas y la activación de los linfocitos proliferados en el punto de la infección puede tanto minimizar la enfermedad como exacerbarla a través del desarrollo de una hipersensibilidad inmunológica, con aumento de la lesión del epitelio respiratorio y de la inflamación. La neumonía es la consecuencia de la respuesta inmunitaria local y limitante del hospedador, se produce, además, una respuesta inmunitaria con formación de anticuerpos específicos de duración limitada, por lo que las reinfecciones son frecuentes y el microorganismo, a veces, persiste, convirtiendo a los pacientes en portadores a largo plazo (Acosta *et al.*, 2011).

De acuerdo con Feld *et al.*, (1992), Le Potier *et al.*, (1992), Morris *et al.*, (1995) y Marois *et al.*, (2007), el tiempo necesario para la seroconversión es de al menos 3-5 semanas después de la infección y la seroconversión se observa más comúnmente después de 11 semanas, por lo que la diferencia en sensibilidad puede repercutir al momento de muestreo. De forma experimental se han detectado anticuerpos 7-9 días después de la infección, alcanzando títulos máximos de anticuerpos 2 meses después de la infección. Cerdas de cría a partir de su segunda a séptima paridad puede permanecer persistentemente infectados (Feld *et al.*, 1992; Djordjevic *et al.*, 1994; Le potier *et al.*, 1992; Morris *et al.*, 1995; León *et al.* 2001; Verdín *et al.*, 2000; Marois *et al.*, 2007; Sibila *et al.*, 2009).

Se ha descrito que a las dos semanas post infección se detecta una elevada cantidad de inmunoglobulinas en las secreciones traqueobronquiales, a las tres y cuatro semanas post infección se observan inmunoglobulinas específicas en la superficie de las células de tejidos linfoides y pulmón. La proporción de células que contienen Ig A e Ig G es de 1:3 en la mucosa nasal y ganglios retrofaríngeos y

de 1:5 en los ganglios linfáticos bronquiales. En lavados traqueo bronquiales se encuentran Ig A, Ig M e Ig G. 5 semanas post infección se han identificado inmunoglobulinas Ig G, a las 8 semanas post infección la inmunoglobulina predominante es la Ig A. Los anticuerpos circulantes Ig M aparecen y desaparecen rápidamente, mientras que los Ig G aparecen después y están presentes en el suero por más tiempo. Altos títulos de Ig M evidencian infección reciente o vacunación y aunque se observan altos niveles de anticuerpos, éstos no confieren protección (Bachmann, 2004; Ciprián *et al.*, 2005).

Un dato importante es que se ha encontrado que hay células dendríticas situadas en el epitelio de las vías aéreas que pueden presentar directamente antígenos hacia las células B, y dirigir sus cambios de isotipo hacia la IgA e IgA2 con la ayuda de las citocinas producidas por las células epiteliales. IgA, IgM e IgE son producidas y secretadas por los monocitos que se encuentran presentes en las secreciones de la nasofaringe; los linfocitos T y B que se encuentran en las secreciones de las superficies mucosas, son derivados desde la amígdala nasofaríngea a través de un proceso activo (Zaldívar, 2002).

La inmunidad celular ha sido medida por las técnicas de transformación blastoide e hipersensibilidad cutánea encontrando una respuesta significativa a las dos pruebas hasta por un periodo comprendido de 44 a 66 semanas post inoculación. Se ha observado que animales recuperados desarrollan una fuerte inmunidad a la enfermedad, cerdos expuestos experimentalmente, cuatro meses después de la primoinfección no desarrollan neumonía, sin embargo esta inmunidad es de corta duración, ya que desarrollaron proceso neumónico a los 11 meses después de una infección inducida (Cruz, 1991).

Según Roof y Zuckerman, citados por Cruz (1991), aunque la infección se presenta a una edad muy temprana, no existen manifestaciones clínicas de la enfermedad en las primeras semanas de vida del lechón, esto se debe a la

protección inmune que le transfiere la madre en las primeras semanas. En tanto que la producción local de anticuerpos se iniciara en el lechón durante las dos primeras semanas de edad y la maduración de linfocitos del cerdo ocurre a partir de la quinta semana de edad, aproximadamente a las 12 semanas la protección materna a declinado y existen efectos negativos derivados por el sistema de producción, manejo, estrés, presión de infección, desarrollando la infección de los cerdos (Cruz, 1991).

Signos Clínicos:

Se caracterizan por tos (principal signo clínico, pero no puede ser observado en todos los cerdos afectados), anorexia, fiebre, disnea y respiración con soplo; Su aparición es lenta, comienza a partir de los 6 días posinfección, con un pico a los 27 días y prácticamente desaparece a los dos meses (Ciprian *et al.*, 2001).

En otros casos, la tos aparece en la fase crónica de la enfermedad y se hace persistente. La tos se caracteriza por ser seca e improductiva, pudiendo estar acompañada por estornudos, aunque los movimientos respiratorios sean normales, y resulta especialmente característica cuando se mueven los animales tras un período de reposo. Estos signos clínicos se pueden observar en el 30 al 70% de los animales. Según evoluciona la enfermedad los signos van desapareciendo, primero la hipertermia y en algunos casos la tos, observándose un retraso en el crecimiento, pelo hirsuto y opaco con disminución de los índices de conversión alimenticia (Epperson, 2002; Luciano *et al.*, 2009).

En los cerdos enfermos a veces aparecen erupciones cutáneas (tizne, eczema costroso) que no están ocasionadas directamente por el agente causal de la neumonía enzoótica, sino que son consecuencia del metabolismo alterado de estos animales (Salceda, 2010).

La severidad clínica está determinada por el tipo de cepa involucrada, la intensidad de la infección, presencia de infecciones secundarias y condiciones ambientales (Thacker *et al.*, 2000; Verdin *et al.*, 2000; Vicca *et al.*, 2003).

Cuando la infección no se complica con patógenos contaminantes, toma un curso subclínico, con signos crónicos leves como tos no productiva, reducción del promedio de la tasa de ganancia de peso diario y reducción en la eficiencia de la conversión alimenticia. Se ha demostrado que los cerdos pueden llegar a ser seronegativos y todavía estar infectados a los 214 días post infección, siendo capaces de infectar a cerdos susceptibles, y que pueden ser seropositivos y no estar infectados a los 254 días post infección (Pieters *et al.*, 2009; Sibila *et al.*, 2009;).

Prevención, control y erradicación:

Se han desarrollado varias estrategias para poder prevenir, controlar y tratar de erradicar esta enfermedad, dentro de las principales medidas aplicadas se encuentran:

- Producción en múltiples fases (1,2 o 3 sitios, todo dentro-todo fuera)
- Establecimiento de tratamientos (medicación continua, pulsátil y estratégica).
- Erradicación: Dinamarca, Reino Unido y Suiza tienen unidades de cerdos libres de *M.h.*, algunos de los métodos que se han aplicado para lograrlo son: histerectomía y aislamiento, sacrificio y repoblación, destete precoz medicado, sistema de saneamiento parcial (Andrada *et al.*, 2003).
- Vacunación.

Los resultados obtenidos mediante el uso de bacterinas y vacunas frente a *M.h.* son variables en términos de minimizar la producción de lesiones neumónicas e incrementar los parámetros productivos (Cruz, 1991).

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

En un estudio realizado por Sibila y colaboradores (2007), se demostró que hubo una reducción del 57- 62% de las lesiones al utilizar la vacuna MYPRAVAC SUIS cuando se aplicó a la edad de 1-3 semanas, y la reducción de lesiones no fue tan significativa cuando se aplicó a las 10 semanas de edad.

En un estudio realizado por Feng Zhi-xin *et al.*, (2010) en donde aplicó una vacuna atenuada vía intrapulmonar, aplicando puntos de acupuntura como vía de inoculación, demostró que esta vía de aplicación induce una respuesta inmune sistémica celular, inmunidad de la mucosa y secreción de IFN locales en las vías respiratorias contra *M.h.*, sin embargo, la observación clínica y la necropsia no arrojaron diferencias significativas en comparación con cerdos sanos. Sí hubo una respuesta humoral sistémica pero se correlacionaba con la protección contra la neumonía. Una de las razones por las cuales no se pudo producir la protección deseada se debe a que algunas proteínas como P97 sólo pueden ser expresadas cuando *M.h.* está adherido a los cilios de las vías respiratorias. Estas proteínas no pueden ser detectadas cuando se cultivan *in vitro*. Por lo tanto, cuando la cepa atenuada fue inoculada en el tracto aspiratorio, algunas proteínas que se perdieron en los pases en cultivos *in vitro* podrían generar una expresar inmunidad más completa, lo cual no se generó con la vacuna inactiva.

Recientemente se ha demostrado que la eficacia de algunas vacunas disminuye cuando los cerdos se infectan por virus PRRS en los momentos de vacunación (Aldaz, 2002).

Aunque la inmunización contra *M.h.* es común y efectiva, se han incrementado los casos de fallas por la mala aplicación de la bacterina, diferencias antigénicas entre las cepas de campo y las cepas vacunales y la presencia de la enfermedad al momento de la de la inmunización. Aunado a esto, los factores de manejo como densidad de población, calidad de aire, calidad de ventilación y un programa de limpieza son muy importantes para controlar la aparición de problemas respiratorios. Sin embargo el método más efectivo y económicamente más rentable es la acción combinada de estas estrategias (Luciano *et al.*, 2009).

Diagnóstico:

Para llevar a cabo el diagnóstico definitivo de cualquier enfermedad es necesario combinar diversos aspectos como historia y signos clínicos, lesiones macroscópicas y microscópicas, identificación del agente por aislamiento, caracterización e identificación, o por técnicas inmunológicas y detección de anticuerpos (Ross, 1999).

Existen varios métodos de diagnóstico, los principalmente utilizados para enfermedades que afectan a los cerdos se encuentran en el cuadro 1:

CUADRO 1. Principales métodos de diagnóstico para enfermedades que afectan a los cerdos.

MICROORGANISMO	PATOLOGÍA	BACTERIOLOGÍA	BIOLOGÍA MOLECULAR	SEROLOGÍA
<u>Virus</u>				
<u>Aujeszky</u>	Histopatología			ELISA
<u>PRRS</u>	Inmunohistoquímica		PCR	ELISA
<u>Influenza</u>	Histopatología			ELISA,
	Inmunohistoquímica			Hemoaglutinación Indirecta
<u>Circovirus Porcino Tipo 2</u>	Histopatología		PCR	ELISA
	Inmunohistoquímica			
<u>Bacterias</u>				
<u>Mycoplasma hyopneumoniae</u>	Histopatología		PCR	ELISA
<u>Actinobacillus pleuropneumoniae</u>		Cultivo, aislamiento e identificación		ELISA
<u>Streptococcus suis</u>		Cultivo, aislamiento e identificación		
<u>Haemophilus parasuis</u>		Cultivo, aislamiento e identificación		
<u>Bordetella bronchiseptica</u>		Cultivo, aislamiento e identificación		
<u>Pasteurella multocida</u>	Histopatología	Cultivo, aislamiento e identificación	PCR	ELISA
<u>Parásitos</u>				
<u>Metastrongylus spp.</u>	Histopatología	Coprología: Recuento de parásitos		
<u>Ascaris suum</u>	Histopatología	Recuento de parásitos		

(Tomado de: Aldaz, 2002).

Dependiendo de la signología y diagnóstico presuntivo se decidirá cuál técnica es la adecuada para llegar a un diagnóstico definitivo. En el caso específico de *M.h.* se describen algunas técnicas como:

Necropsia:

Es un procedimiento por el cual se estudia un cadáver animal para tratar de identificar la posible causa de la muerte, su utilidad depende de la habilidad y experiencia del veterinario que la realiza. Hay que considerar que la sensibilidad del método es baja desde el punto de vista diagnóstico, pero es útil para decidir futuros análisis y hacer un diagnóstico diferencial inicial (Aldaz, 2002).

Histopatología:

Es el diagnóstico y estudio de padecimientos por el análisis de muestras de tejidos o células. La experiencia del patólogo es crítica. Los resultados decidirán qué tipo de agentes infecciosos hay que buscar. Las lesiones patognomónicas no ayudan mucho. La asociación con otros microorganismos y la presencia de lesiones que no son propias del *Mycoplasma* pueden conducir a resultados falsos negativos o equívocos en el diagnóstico (Van Til *et al.*, 1991; Aldaz, 2002).

Aislamiento:

El aislamiento de *M.h.* de los pulmones afectados es considerado el "estándar de oro" en las técnicas de diagnóstico, pero el aislamiento de este patógeno requiere de un medio especializado "Friis", aunque es muy laborioso, lento y no es económico, es confiable (Friis, 1975; Sibila *et al.*, 2009; Luciano, 2009).

Los medios de cultivo deben contar en su fracción proteínica con factores de crecimiento que se encuentran contenidos en el suero. Todos los *Mollicutes* tienen sistemas respiratorios truncados, las escasas vías metabólicas, están principalmente dedicadas a la generación de energía y en mucho menor grado a proporcionar sustratos para las vías sintéticas. Compensan la escasez de vías metabólicas mediante la capacidad de sus enzimas para interactuar con

numerosos sustratos. Carecen del ciclo del ácido tricarboxílico completo, no tienen quinonas ni citocromos y carecen de la vía de la fosforilización oxidativa para la generación del ATP. De modo, que los mecanismos generadores de energía dan lugar a una muy baja producción de ATP. Entre los aminoácidos más importantes están la glutamina y la asparagina, el primero de ellos es el componente necesario para el crecimiento y que no es sintetizado por los *Mycoplasmas*. Los lípidos y las proteínas participan en la composición de la membrana. Uno de los lípidos de mayor importancia es el colesterol (el suero fresco de caballo, es la fuente de colesterol requerida para su desarrollo). Estos gérmenes desdoblan mediante la glucólisis el glucógeno, almidón, dextrina, maltosa y glucosa, siendo su fuente principal de energía el desdoblamiento hasta lactosa y ácido acetoacético. Este curso del metabolismo es el responsable del lento crecimiento. Otras de las sustancias nutricias precisas para el crecimiento de los *Mycoplasmas* son los ácidos ribonucleico y desoxirriboucleico, en la biosíntesis de DNA, las timidinas desempeñan un importante papel. Las necesidades vitamínicas se basan principalmente en rivo flavina, tiamina y nicotinamida. Las especies del género *Mycoplasma* se desarrollan en un pH entre 7,0 - 7,8 (Eichwald *et al.*, 1973; Ciprián *et al.*, 2005; Acosta *et al.*, 2011; Fernández, 2012).

Características de aislamiento:

En un cultivo primario se desarrollan al cabo de 3 a 7 días sobre medios sólidos, las primeras colonias hacen su aparición a los tres días; la formación de vacuolas en los bordes de las colonias se observa a los 5 días, las sinuosidades marginales, fisuras y surcos resultan visibles hacia el día 7. Cepas desecadas, liofilizadas y guardadas por más de un año se aprecia un crecimiento alterado a partir de los 6 a 8 días. Las colonias típicas son ligeramente convexas en su superficie, estas colonias se visualizan mal a simple vista y están desprovistas de protuberancia central típica que le da la apariencia de huevo estrellado, algunos autores la observan “como gotas de rocío”. La forma de las colonias depende del

medio nutritivo, las colonias grandes aparecen, condicionadas por la sustancia nutritiva, en el borde de la placa. La disminución de la tasa de agar del 0.5 al 0.3% da como consecuencia colonias pequeñas y rugosas o bien la falta de una formación regular de colonias. Normalmente el tamaño de las colonias oscila entre 0.1 a 1.0 mm de diámetro (hasta 2 mm), en los cultivos primarios se encuentran preferentemente colonias de tamaño pequeño y mediano. Los *Mycoplasmas* sembrados en medio sólido penetran mediante capilaridad, junto con el agua circundante, en el gel de agar, en el que comienza el crecimiento de colonias. En el medio líquido producen ligero enturbamiento (Cruz, 1991; Bachmann, 2004; Salceda, 2010).

Cuando se tiñen con Giemsa, se observan cocobacilos delgados de 0.1 a 0.2 μm diámetro, o como ramificaciones pequeñas de 0.1 a 0.2 μm de grosor. En cultivos celulares crece formando grupos difusos de cocos de 0.5 μm de diámetro, en cadenas cortas o anillos de 3 μm de diámetro conteniendo una estructura parecida a un coco. El volumen aproximado que se obtiene del medio de cultivo es de 5-20 mg/litro de medio (Cruz, 1991).

Forma de reproducción en los medios de cultivo:

El modo de reproducción de los *Mycoplasmas* es por fisión binaria, sin embargo el proceso no es tan idéntico al resto de los procariontes. La división citoplasmática no está sincronizada con la replicación del genoma sino que está retardada, resultando en la formación de filamentos multinucleados. Estos microorganismos crecen a partir de formas granulares llamados micelios bifurcados cuyos filamentos se desarrollan formando cadenas de células esféricas. Los filamentos largos producen una serie de gránulos, y los cortos sólo forman gránulos en los extremos hasta constituir corpúsculos esferoidales, vesiculares o grandes formaciones protoplasmáticas delicadas que se fragmentan dando origen a células individuales (Eichwald *et al.*, 1973; Ramos 2011).

Algunos de los principales métodos de coloración de las colonias de *Mycoplasmas* son: método dienes (las colonias de *Mycoplasma* exhiben color azul oscuro; el agar azul claro) y método de orceína (las colonias de *Mycoplasma* se tiñen de color rojo oscuro; el agar, rojo claro) (Eichwald *et al.*, 1973).

Sorensen *et al.*, (1997), compararon la detección de *M.h.* por cultivo bacteriológico, ensayo de inmunofluorescencia (IFA), ensayo inmunoenzimático (ELISA) y por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y el cultivo es la técnica más sensible sobre todo en las últimas etapas de la neumonía enzoótica cuando hay menor cantidad de *Mycoplasma*. Sin embargo, *M.h.* se considera un microorganismo fastidioso (el aislamiento de muestras de campo requiere de 4-8 semanas) y con frecuencia los medios de cultivo puede llegar a ser contaminados con *Mycoplasma hyorhinis* o *Mycoplasma flocculare* (Sorensen *et al.*, 1997; Sibia *et al.*, 2009).

Pruebas bioquímicas:

Prueba de dependencia de esteroides: el ensayo para establecer los requerimientos de esteroles constituye un elemento esencial en la identificación y descripción taxonómica de los *Mollicutes*. Mediante este ensayo pueden identificarse *Acholeplasma* y *Mesoplasma*, que no requieren colesterol para su desarrollo, mientras los demás *Mollicutes* sí lo necesitan. Esta prueba está fundamentada en la evidencia de inhibición del crecimiento por la digitonina, sustancia que interactúa con el colesterol del medio de cultivo y no permite su asimilación por los microorganismos que lo requieren como factor nutritivo esencial. Para la realización de esta prueba se requieren discos de papel filtro impregnados con una solución de digitonina al 1.5%, posteriormente estos discos se colocan sobre los medios de cultivo sólidos los cuales han sido sembrados con *Mycoplasmas* sospechosos. La formación de un halo alrededor del disco sin crecimiento indica dependencia.

Prueba de fermentación de carbohidratos: algunas especies de *Mycoplasmas* de interés son capaces de metabolizar azúcares, más específicamente la glucosa mediante la vía fermentativa. La técnica se basa en la demostración de disminución del pH durante el crecimiento de los microorganismos en presencia de glucosa en el medio de cultivo o más directamente en la medición de la desaparición de la glucosa o en la determinación de los productos ácidos o de la actividad hexoquinasa. Un cambio del color amarillo del medio nos indica una reacción positiva.

Prueba de reducción del tetrazolio: Esta prueba nos sirve para determinar si el *Mycoplasma* es fermentativo o no, por la capacidad de reducir el colorante tetrazolio (cloruro de 2, 3,5- trifenil tetrazolio). Si hay formación de una mancha rosada en el agar que contiene tetrazolio a una concentración de 0.03%, será positivo, si no hay cambio de color será negativa.

Prueba de hidrólisis de arginina: este ensayo permite diferenciar a los *Mycoplasmas* que utilizan este aminoácido mediante un cambio de color del medio. Se fundamenta en la característica fisiológica de estos microorganismos de producir ATP a expensas de la hidrólisis de este aminoácido y la consecuente liberación de amonio, lo que causa un aumento del pH del medio y el viraje del indicador. Una reacción color púrpura se da como positiva.

Prueba de hidrólisis de urea: Esta prueba nos sirve para detectar la capacidad de desdoblarse a la urea en amoníaco. Se incuban los *Mycoplasmas* en medio líquido con urea, una reacción positiva nos dará una coloración rosa.

Prueba de producción de peróxido de hidrógeno: Esta prueba nos sirve para determinar si este agente es capaz de producir peróxido de hidrógeno *in vitro* en medios de cultivo sólido. En la prueba se utilizan eritrocitos tipo O de humano y la presencia de la producción del peróxido se detecta por medio del daño que les

causa. Los glóbulos rojos son mezclados con azul de metileno. Una reacción positiva se manifiesta cuando se tiñen los eritrocitos de color azul que rodean a las colonias de *Mycoplasmas* (Friis, 1975; Boughton y Thorns, 1976; Roberts y Pijoan, 1977; Whitford *et al.*, 1994).

En el caso de *M.h.* y *M. flocculare* (un agente no patógeno, común de los pulmones del cerdo), no se presentan unas reacciones claramente definidas frente a la fermentación de la glucosa y manosa, son negativos a la hidrólisis de la arginina y a la fosfatasa, manifestando variabilidad en la formación de películas y cristales y reducción del tetrazolio; en cambio, *M. hyorhinis* fermenta la glucosa pero no la manosa, es negativo a la hidrólisis de la arginina y produce fosfatasa, reduciendo el tetrazolium tanto en aerobiosis como en anaerobiosis. De lo anterior se desprende, de que el estudio de la fermentación de la glucosa y la hidrólisis de la arginina son pruebas básicas de orientación, pero en todo caso deben ser complementadas con la identificación serológica (Salceda, 2010).

Epiimmunofluorescencia:

Es una variante de la prueba de inmunofluorescencia, utilizando también un suero específico, esta prueba se realiza directamente sobre las colonias del *Mycoplasma* en un medio sólido, La observación de colonias fluorescentes indican una reacción positiva (Friis, 1975; Boughton y Thorns, 1976; Roberts y Pijoan, 1977; Whitford *et al.*, 1994).

Inhibición metabólica e inhibición de crecimiento:

Son pruebas de neutralización, la cual se lleva a cabo por medio de un antisuero homólogo, el cual ejerce una actividad inhibitoria. La diferencia básica es que la prueba de inhibición metabólica se realiza en medio líquido y la prueba de

inhibición de crecimiento se realiza en medio sólido (Friis, 1975; Boughton y Thorns, 1976; Roberts y Pijoan, 1977; Whitford *et al.*, 1994).

Anticuerpos fluorescentes o Inmunofluorescencia (IFA):

La fluorescencia directa se basa en la detección de antígenos de *M.h.* en las vías respiratorias de pulmones infectados a través de la utilización de un anticuerpo policlonal conjugado con un fluorocromo. La practicidad de este ensayo en el campo es cuestionable, ya que se necesita que estos pulmones lleguen frescos al laboratorio para poder llevar a cabo la prueba con precisión. Esta prueba puede ser ambigua debido a que el *M.h.* comparte determinantes antigénicos con *M. flocculare* y *M. hyorhinis*, la técnica funciona bien en fases agudas de la enfermedad ya que existen grandes cantidades de *Mycoplasmas* en el pulmón, y peor en enfermedades crónicas; además en procesos crónicos pese a obtenerse las muestras de lesiones neumónicas claras no se puede demostrar la presencia de *M.h.* en la lesión, porque el número de *Mycoplasmas* desciende, a medida que el proceso se hace crónico, la fluorescencia indirecta es más sensible, pero necesita más tiempo para ser realizada (Bachmann, 2004).

En un estudio realizado por Cruz *et al.*, (2003), se demostró la presencia de *M.h.* en el tracto respiratorio a partir del cuarto día post infección con la técnica de inmunofluorescencia, al día 8 se detectó el fenómeno de agrupamiento de los cilios, el día 20 se observaron grandes focos fluorescentes tanto en mucosa como en el exudado de bronquiolos. Esto coincidió con la presencia de lesiones a partir del día 4 post inoculación, alcanzando su mayor magnitud al día 20 post infección. En otro estudio se visualizó la presencia de *Mycoplasma* con la técnica de inmunofluorescencia hasta la semana 12 postinfección. También se demostró que existen puntos fluorescentes fuera de la mucosa a partir del día 8 postinfección lo que podría indicar el acarreo del *Mycoplasma* por las células del sistema inmune al tejido linfoide más cercano, con lo cual se cree que ejerce la doble función de

destrucción de cilios y la liberación de proteínas o toxinas que inician la modulación de la respuesta celular (Cruz *et al.*, 2003).

Inmunohistoquímica (IHC):

Se utiliza para la detección de antígenos que se encuentran en los tejidos frescos, fijados con formalina e incluidos en parafina, evidenciado por la formación de un complejo antígeno-anticuerpo, visualizado con un microscopio estándar. Se utilizan anticuerpos marcados con una enzima (peroxidasa) que por una reacción colorimétrica revela la presencia del antígeno. La sensibilidad de esta prueba se ha tratado de incrementar al utilizar anticuerpos monoclonales, es una técnica muy cara y requiere de mucho tiempo (Dubarry, 2005).

A pesar de que la IHC y el ensayo de inmunofluorescencia detectan específicamente *M.h.* en secciones de tejido pulmonar o manchas, estas técnicas tienen el inconveniente de que el diagnóstico sólo puede hacerse post-mortem. La calidad de los anticuerpos utilizados en estos métodos también puede limitar la detección específica, dado que los anticuerpos policlonales pueden tener un enlace con otros *Mycoplasmas spp* estrechamente relacionados (Cruz *et al.*, 2003; Abeledo *et al.*, 2005).

A pesar de IHC utiliza anticuerpos monoclonales o policlonales específicos de *M.h.* fijados con formalina, la técnica no se utiliza rutinariamente en el laboratorio debido a su limitada sensibilidad (Sibilia *et al.*, 2009).

Pruebas de diagnóstico molecular:

Las técnicas principales son: la hibridación *in situ*, PCR (y sus variantes) y tipificación molecular. La primera permite detectar y localizar secuencias específicas de ácidos nucleicos (ADN o ARN) sobre preparaciones cromosómicas,

extensiones celulares, cortes de tejido y cortes ultrafinos utilizados para el estudio al microscopio y las dos últimas nos permiten amplificar, detectar, identificar y clasificar a un microorganismo utilizando un fragmento de ADN (Abiven *et al.*, 1992; Espinet *et al.* 2012; Fernández, 2012).

Estas técnicas han demostrado detectar al agente desde el día 28 post infección. Son rápidas y relativamente baratas; sin embargo existe una elevada probabilidad de contaminación de muestras (Calsamiglia *et al.*, 2000; Verdin *et al.*, 2000; Dubosson *et al.*, 2004; Fernández, 2012).

Pruebas de diagnóstico serológico:

La serología es la herramienta más común empleada para el diagnóstico de *M.h.* Las pruebas serológicas detectan el momento en que se da la seroconversión, más no el momento preciso en que se da la infección. La presencia de anticuerpos no está correlacionada con la enfermedad clínica o con el porcentaje de neumonía. La vacunación contra *Mycoplasma* complica la interpretación serológica y los anticuerpos inducidos por vacunación no pueden ser diferenciados de la infección natural. Adicionalmente, es cuestionable cuando el animal elimina completamente los microorganismos del tracto respiratorio y se vuelve resistente a la neumonía por *Mycoplasma* (Bachmann, 2004).

ELISA: Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas. Utiliza como sus siglas lo indican una enzima como marcador para mediar la formación de complejos antígeno-anticuerpo; es un método rápido, barato y fácil de automatizar que proporciona información útil sobre la presencia de anticuerpos derivados de la madre y anticuerpos adquiridos, así como el tiempo en el cual se da la seroconversión de los animales. La ELISA de bloqueo (IDEI, *Mycoplasma hyopneumoniae* kit EIA, Oxoid) y dos pruebas de ELISA indirecto (HerdCheck, IDEXX y Tween 20-ELISA) son las pruebas serológicas más frecuentemente

usadas para detectar anticuerpos contra *M.h.*, aunque se han desarrollado diversas técnicas de ELISA para el diagnóstico con buenos resultados (Strasser *et al.*, 1992; Djordjevic *et al.*, 1994; Verdin *et al.*, 2000; Okada *et al.*, 2005; Sibilia *et al.*, 2009; Zhi-Xin *et al.*, 2010).

Se ha demostrado que la técnica de ELISA es más sensible que otros ensayos, es compatible con un alto volumen de pruebas, y los anticuerpos pueden ser detectados por más de 1 año después de la exposición. Después de la infección con *M.h.* los anticuerpos pueden tardar en aparecer entre cuatro a seis semanas aunque se ha reportado que la prueba de ELISA detecta anticuerpos 2-3 semanas después de la exposición y persisten por un periodo de 52 semanas (Armstrong *et al.*, 1983; Bereiter *et al.*, 1990; Abeledo *et al.*, 2005; Ameri *et al.*, 2006).

En infecciones a las seis semanas de edad los anticuerpos aparecen a las tres semanas postinfección, alcanzan el pico máximo a las 8 semanas y descienden progresivamente hasta desaparecer al año después de la infección. En animales infectados a las dos semanas de edad, aparecen anticuerpos a las dos semanas seguidas a la infección, siendo además mayor la tasa de anticuerpos que cuando se infectan a las 8 semanas. En otras pruebas realizadas con la técnica de ELISA se observa que después de infectar animales con dos semanas de edad, aparecen anticuerpos a las tres semanas de edad, produciéndose el pico más alto a las 10-12 semanas postinfección y después los anticuerpos van cayendo regularmente. Por lo tanto, en animales infectados en las primeras semanas de vida la técnica de ELISA detecta anticuerpos a las 2-3 semanas postinfección, alcanzándose la respuesta más alta entre las 8-12 semanas postinfección y a partir de aquí decaen hasta desaparecer al año, si no ha habido reinfecciones durante este periodo (Andrada *et al.*, 2003).

ELISA indirecto: El fondo de los pocillos está recubierto por el antígeno, luego de agregar el suero problema e incubarlo, los anticuerpos específicos a *M.h.* se ligan

a este antígeno para formar un complejo antígeno-anticuerpo. Luego de incubar y lavar, se agrega un conjugado que posee un marcador (peroxidasa), el que se liga a los anticuerpos, el conjugado que no se ligó es removido con el lavado. Posteriormente se adhiere el sustrato que contiene cromógeno. La reacción medible es el cambio de color en comparación con el control positivo y se expresa como densidad óptica (OD) (Bachmann, 2004).

Nicolet y colaboradores (1980) y Bommeli y Nicolet (1983) desarrollaron un ELISA indirecto que usa un extracto con Tween 20 para la detección de anticuerpos contra *M.h.*, minimizándose las reacciones cruzadas con otros agentes (Luciano, 2009).

ELISA de bloqueo: En esta prueba los pocillos están cubiertos por el antígeno a estos se les agregan anticuerpos monoclonales o enzimas ligadas al suero positivo. La competencia se da entre ambos compuestos agregados anteriormente, causando una reacción de color si el sustrato se logra adherir. Debido a que este ensayo usa anticuerpos monoclonales (anticuerpo monoclonal contra la proteína de 74 Da de *M.h.*), no se dan las reacciones cruzadas con otras especies de *Mycoplasmas*; sin embargo, algunas vacunas manifiestan poca respuesta serológica al epítipo de esta prueba, por lo que puede ser negativa en animales vacunados, mientras que el resultado puede ser positiva con ELISA indirecto (Bachmann, 2004; Luciano, 2009).

ELISA doble sándwich: consiste en purificar el anticuerpo monoclonal (Mab) contra el antígeno de superficie de 46 kDa (p46) de *M.h.* y la proteína recombinante p46 expresada en *Escherichia coli* para la detección de anticuerpos frente a *M.h.* en muestras de suero de cerdos. El Mab se añade a cada pocillo de la placa de fondo plano, posteriormente el antígeno recombinante se añade a cada pocillo y finalmente se añade el suero a muestrear. Con esta técnica Okada y colaboradores en el 2005 demostraron que no existe reacción cruzada con otros

Mycoplasmas y la detección de anticuerpos fue a las 2-3 semanas post-inoculación, la respuesta más alta entre las 8 – 15 semanas postinfección y a partir de aquí decaen.

Fijación del complemento: tiene como fundamento la formación de anticuerpos fijadores de complemento en el suero como resultado de una infección. Un anticuerpo se une al antígeno y este complejo fija el complemento. Para poder determinar si la primera reacción ocurrió, se utiliza un sistema revelador que consta de otro juego de complejo de antígeno-anticuerpo que fijara el complemento si este no fue fijado en la primera reacción. Este segundo complejo se llama “sistema hemolítico” donde se utilizan glóbulos rojos de carnero y anticuerpo contra esos glóbulos o hemolisina; los anticuerpos frente a *M.h.* se detectan a las dos semanas postinfección, pero no se detectan pasados cinco meses postinfección. Además presenta otra desventaja detecta Ig M cuya vida en el suero es muy corta. (Takatori, 1970; Herrero, 2004).

Al comparar la prueba de fijación del complemento con ELISA para detectar anticuerpos en infecciones tempranas de *Mycoplasma*, el análisis estadístico reveló que la primera detectó la presencia de anticuerpos entre la tercera y quinta semana, y la segunda prueba en la segunda semana, demostrando que ELISA es más sensible (Ciprián *et al.*, 2005).

Inhibición de la hemoaglutinación: Tiene alta especificidad y sensibilidad pero su ejecución no es fácil para todos los laboratorios por lo que no se realiza en forma rutinaria. A partir de lavados pulmonares detecta todas las clases de inmunoglobulinas, aunque de forma más marcada las IgA; es útil en el diagnóstico de infecciones tempranas. Al ser comparada con la prueba de fijación del complemento demostró que los títulos de anticuerpos se pudieron identificar en fases tardías de la infección (Takatori, 1970).

Hemaglutinación indirecta: también llamada hemaglutinación reversa pasiva, se basa en la propiedad que tienen los anticuerpos de producir aglutinación específica en presencia de glóbulos rojos sensibilizados con los correspondientes antígenos. Se utilizan glóbulos rojos tanizados a los cuales se les adhiere un antígeno con polisacáridos o glicoproteínas. La sensibilidad es mayor en las formas crónicas que en las agudas, la especificidad se considera buena (Botero y Restrepo, 2003).

Otras técnicas descritas son aglutinación en tubo, aglutinación rápida en placa (Boughton y Thorns, 1976; Ciprián, 1987; Ciprián *et al.*, 2005).

Western blot (WB): Cuando hay discrepancia en los resultados de las pruebas serológicas, el inmunoensayo Western Blot (WBI) puede ser usado como una prueba confirmatoria (Sibilia *et al.*, 2009).

La transferencia de proteínas o *blotting* supone la inmovilización de las proteínas (o ácidos nucleicos) sobre membranas sintéticas, seguido de la detección empleando sistemas especialmente diseñados para la tinción de *blots*. En el Western blot las proteínas son separadas en primer lugar mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y posteriormente se transfieren a una membrana, mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular al gel (*electroblotting*). Una vez completada esta operación la proteínas de interés son reveladas por el agregado de un anticuerpo específico (Stock, 2007).

En un estudio realizado por Ameri y colaboradores en el 2006, demostró que el inmunoensayo Western blot dirigido a antígenos de *M.h.* de la cepa 232 con masa molecular de 150, 130, 74 y 70 kD es una prueba útil en la resolución de discrepancias serológicas de los resultados obtenidos con otras pruebas, además

demonstró que no existe reacción cruzada con otros Mycoplasmas como *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma flocculare* y *Mycoplasma hyosynoviae*.

Aglutinación: su principio se basa en la reacción antígeno-anticuerpo. Un antígeno celular o de partículas insolubles es aglutinado directamente por el anticuerpo. Las pruebas de aglutinación son extremadamente sensibles, pudiéndose detectar incluso niveles de anticuerpos de 1 µg/ml. Muchas de estas pruebas se utilizan para el diagnóstico de infecciones microbianas en curso o ya pasadas, mediante la identificación de los anticuerpos presentes en el suero, que se producen como respuesta a la infección. El reactivo de la prueba contiene antígenos microbianos conocidos; la prueba es positiva si los antígenos del reactivo aglutinan con los anticuerpos del suero del paciente quien probablemente ha sido infectado por el microorganismo en cuestión, ya sea recientemente o en el pasado (Takatori, 1970; Ciprián *et al.*, 2005).

La prueba de aglutinación puede ser directa o indirecta. En la prueba de aglutinación directa intervienen antígenos o anticuerpos que forman parte de manera natural de una partícula de mayor tamaño, como un microorganismo o un eritrocito; si la partícula es un eritrocito, la prueba se denomina prueba de hemaglutinación. En la prueba de aglutinación indirecta los antígenos o los anticuerpos se adsorben de forma artificial a una partícula, por ejemplo, una partícula de látex (Ingraham e Ingraham, 1998).

Las pruebas cualitativas de aglutinación se realizan generalmente sobre un portaobjetos y son muy fáciles de ejecutar. Para ello, se combina una gota de la muestra clínica con una gota del reactivo de la prueba; si se produce la aglutinación, se forma un coágulo y la prueba es positiva, indicando la presencia de anticuerpos. Si no se produce la aglutinación, no se forma el coágulo y el resultado de la prueba es negativo (Ingraham e Ingraham, 1998).

Las pruebas cuantitativas de aglutinación consisten en realizar diluciones seriadas de una muestra clínica dada hasta que no se produzca la reacción de aglutinación con el reactivo de la prueba. Los resultados normalmente se expresan como un título (la mayor dilución del suero problema que da una reacción positiva de aglutinación). En una típica prueba de aglutinación cuantitativa, se ponen en contacto con un antígeno patrón las distintas diluciones seriadas de la muestra que contiene un determinado anticuerpo. Las diluciones generalmente se realizan a la mitad, es decir, que cada uno de los tubos contiene como mucho la mitad del contenido en la muestra del tubo anterior. El título de anticuerpos es la última dilución a la cual todavía se produce la aglutinación (Ingraham e Ingraham, 1998).

Las partículas de látex son partículas de poliestireno de diferentes diámetros, aquellas partículas cuyo diámetro es mayor a 0.5μ las fuerzas gravitacionales influyen en ellas ampliamente y sedimentan lentamente, esto disminuye cuando aumentan las fuerzas de repulsión entre ellas. Son muy estables, no deben congelarse a menos que estén unidas o recubiertas de proteína. Cada partícula está rodeada de una nube iónica organizada en una estructura en dos capas, con cargas negativas en la superficie de la partícula (grupos sulfato, carboxilo, etc.) y contraiones positivos formando una doble capa eléctrica. Cuando dos partículas de látex se acercan están sujetas a dos tipos de fuerzas opuestas: la atractiva de Van Der Waals y la de repulsión electrostática que se origina por el desplazamiento de los contraiones cuando las dobles capas se solapan, la suma de ambas fuerzas corresponde a la barrera energética que impide la coagulación de las partículas. La adición de polímeros naturales como proteínas, aumenta la estabilidad de las partículas de látex, debido a la introducción de grupos químicos ionizables o altamente polares en la superficie de la partícula (unión covalente). La mayoría de los reactivos que utilizan partículas de látex se han desarrollado sensibilizando las partículas de poliestireno mediante la adsorción hidrofóbica del antígeno o anticuerpo en su superficie, de esta forma pueden adsorber proteínas fuerte o irreversiblemente (dependiendo del pH, fuerza iónica y temperatura; masa molar

punto isoeléctrico y balance hidrofílico-hidrofóbico de la proteína) (Fuentes *et al.*, 1998).

Kende (1969) desarrolló la técnica de aglutinación en látex (LA), describió la capacidad de adsorción de partículas de látex por *Mycoplasmas* vivos y su aglutinación por antisuero específico. La estandarizó, y al comparar su sensibilidad con la prueba reducción de la inhibición del tetrazolio (TRI) y fijación del complemento (FC), se demostró que la prueba LA es fácil de realizar y no se ve afectada por el tiempo de la sensibilización de partículas de látex o la concentración de látex, también puede ser un método útil para medir la respuesta de anticuerpos a las vacunas.

Esta prueba demostró varias ventajas con respecto a otros métodos serológicos para medir anticuerpos contra *Mycoplasma*, una de ellas es que se requiere una mínima cantidad de microorganismo para realizarla (23 μ g de proteína y 230 μ g de células). La inhibición del crecimiento requiere de un crecimiento activo del medio de cultivo y la producción de potentes sueros de referencia es difícil. La prueba de FC es engorrosa y la presencia de reacciones cruzadas obstaculiza la prueba (Morton 1966; Kende, 1969).

En otro estudio realizado por Slavik y Switzeren (1979), se demostró que la prueba de aglutinación en látex, pero ahora en tubo (LAT), detectó anticuerpos por primera vez en cerdos inoculados con *M.h.* 2-3 semanas después de la inoculación y se mantuvo hasta la necropsia a las 24 semanas, momento en el que los pulmones de los cerdos fueron macroscópicamente normales. En cerdos inoculados experimentalmente se detectaron anticuerpos hasta las 48 semanas post inoculación. Al hacer una comparación entre esta prueba y la prueba de fijación del complemento (FC), se encontró que la prueba de látex es capaz de detectar brotes de neumonía por *Mycoplasma* porcina antes que la prueba de FC, pero la prueba de FC sería un indicador más preciso de animales infectados

activos por *Mycoplasma* que la LAT. En este estudio también se demostró que los sueros de cerdos inoculados con otros *Mycoplasmas* porcinos, incluyendo *Mycoplasma hyosynoviae* y *Mycoplasma hyorhinis*, no presentaron reacción positiva. Además, no fueron detectables anticuerpos en LAT usando sueros de cerdos infectados con *Metastrongylus* spp., *Ascaris suum*, o en el suero de cerdos vacunados.

Muchas veces es muy importante clarificar la meta precisa de una prueba. Si se desea determinar el ambiente limpio de una enfermedad dada, varios factores deben ser considerados en la prueba diagnóstica, como serían: sensibilidad, especificidad, nivel de prevalencia esperada y nivel de confianza satisfactoria. Entendiéndose como sensibilidad a la habilidad de una prueba para detectar a todos los verdaderos positivos y especificidad como la habilidad de una prueba para detectar solo a los verdaderos negativos. Si la prueba es 100% sensible no presentaría falsos negativos (no falla para detectar a los verdaderos positivos); si la prueba es 100% específica no presentaría falsos positivos (no falla para detectar a los verdaderos negativos). Sin embargo, la sensibilidad y la especificidad van de la mano, es decir cuando se afecta uno también el otro. El efecto esperado es cuando aumenta la sensibilidad, puede disminuir la especificidad o bien cuando aumenta la especificidad, puede disminuir la sensibilidad. Si fuera 100% sensible y 100% específica se estaría frente a una prueba perfecta. Desafortunadamente existen pocas pruebas perfectas en el mundo, y se tiene que determinar un cierto nivel de aceptabilidad (Mendoza y Ciprian, 2004).

Se debe tener muy claro, qué pregunta específica se quiere contestar con la prueba a utilizar y que a la vez sea económica. La popularidad de la prueba afecta también el precio, una demanda de la prueba hace que el laboratorio, se equipe y adquiera los reactivos necesarios para llevarla a cabo y la hace menos cara. De ahí, que los laboratorios estén considerando el costo de las nuevas pruebas y las

estén comparando con el costo de las viejas pruebas, y a la vez estén analizando las ventajas y desventajas de las mismas aceptabilidad (Mendoza y Ciprian, 2004).

Actualmente a nivel de campo existe una prueba rápida de aglutinación sérica en placa de cristal para el diagnóstico serológico de *Mycoplasma*, y esta aceptado por la OIE (Organización Internacional de Epizootias) pero sólo es utilizado en aves. Para el diagnóstico en cerdos no existe una prueba de campo que se haya desarrollado (OIE, 2013).

Desde el punto de vista epidemiológico, los hallazgos serológicos indican que la prevalencia de la neumonía enzoótica es alta en cerdos en las etapas de crecimiento y finalización, por lo que las edades más adecuadas para las pruebas de diagnóstico serológico son de los 5 a 6 meses (cerdos en etapa de engorda) y de los 6 a 7 meses de edad (cerdas de reposición) (Salceda, 2010).

JUSTIFICACIÓN

La neumonía enzoótica se ha subestimado como enfermedad ya que solo se atiende cuando se presentan asociaciones con otros microorganismos que ocasionan enfermedades fulminantes en la granja. Se ha demostrado su presencia en el 90% de las granjas y 80% de los cerdos a nivel mundial. Al infectarlos, ocasiona daños a nivel pulmonar, que aunque pueden no ser sintomáticos afectan en gran medida ya que se presentan reducciones hasta el 15.9% en el índice de crecimiento y 12.16% en la eficiencia y conversión alimenticia, aunado a esto, al presentarse signología clínica, ocasiona pérdidas económicas de hasta 200 millones de dólares por concepto de medicamentos y manejo adicional cuando el diagnóstico no es acertado (Bachmann, 2004; Luciano *et al.* 2009).

Actualmente no existe en el mercado una prueba serológica de campo rápida, sencilla y confiable para el diagnóstico de la Neumonía Enzoótica o Micoplasmosis Porcina. La mayoría de las pruebas desarrolladas actualmente, sólo pueden ser llevadas a cabo por personal capacitado, equipo y material de laboratorio; además de que los costos no permiten que varias de estas pruebas puedan ser aplicadas a nivel de campo. Por lo anteriormente mencionado en este trabajo se pretendió desarrollar una prueba que facilite la detección y control de la enfermedad en granja y para ello se utilizó la prueba denominada “Co-aglutinación” (patente en trámite por la UNAM, No.989690).

HIPÓTESIS

Si la prueba de Co-aglutinación identifica a los animales infectados con *Mycoplasma hyopneumoniae*, entonces podría ser utilizada como un método de diagnóstico rápido y sencillo a nivel de campo.

OBJETIVOS

General:

Desarrollar y evaluar una prueba serológica de Co-aglutinación utilizando como elemento facilitador de la visualización de la reacción las partículas de látex, para el diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae* a nivel de campo.

Específicos:

1. Verificar que la cepa de referencia J NCTC 10110, utilizada en este trabajo sea *Mycoplasma hyopneumoniae*.
2. Elaborar una prueba de diagnóstico a partir de la técnica de aglutinación, utilizando partículas de látex como elemento facilitador del diagnóstico.
3. Determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba mediante la utilización de sueros de animales de varios experimentos controlados y de varias granjas.
4. Comparar los resultados obtenidos con los resultados de la técnica de ELISA de bloqueo.

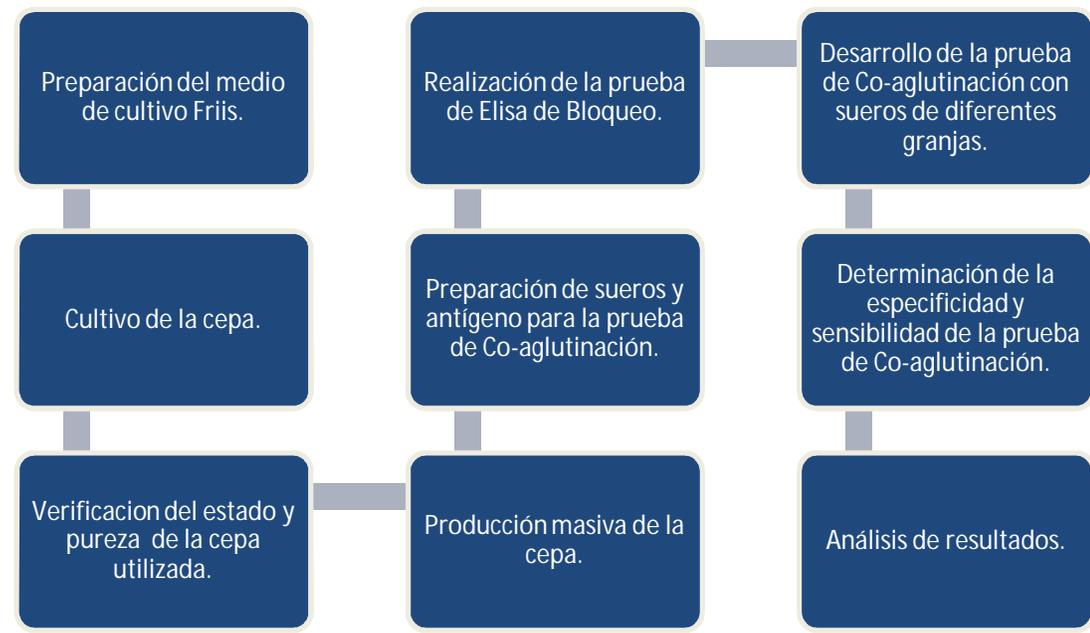
MATERIAL Y MÉTODO

Lugar de Trabajo:

El trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de las Enfermedades Respiratorias del Cerdo y Virología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 1, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Diseño de Investigación

Diagrama 1



1.- Preparación del medio de cultivo Friis.

La metodología que se siguió en la preparación de los medios del cultivo se basa en lo descrito por Whitford y colaboradores en 1994 con algunas modificaciones:

HBSS- parte A	50 ml
HBSS- parte B	50 ml
Caldo de infusión cerebro corazón	5.0 gr
Caldo PPLO sin cristal violeta	5.2 gr
Rojo de fenol (0.5% de la solución)	4.5 ml
DNA	30 mg
Agua destilada	1000 ml

Para preparar los medios sólidos se utilizó Agar noble a una concentración de 12 gr/litro.

Al momento de su uso se colocaron 50 ml de la solución “A” y se aforaron con agua destilada hasta 800 ml, después se agregaron 50 ml de la solución “B” y se aforó hasta 1000 ml, se agregan los demás componentes y se procedió a esterilizar los medios a 15 psi por 15 a 30 min, ya en condiciones de esterilidad se agregaron:

Extracto de levadura	60 ml
Penicilina	1000 UI/ml
Suero de cerdo	165 ml
Suero de caballo	165 ml

Finalmente los medios se colocaron a 37°C a prueba de esterilidad para verificar que no estuviesen contaminados y así proceder a su utilización.

Para preparar las parte A y B se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

HBSS (Solución de Sal Balanceada y Modificada de Hank's)

Parte A

NaCl	80 gr
KCl	4 gr
MgSO ₄ . 7H ₂ O	1 gr
MgCl ₂ . 6H ₂ O	1 gr

Se disolvieron en 400 ml de agua destilada. Se agregaron 1.4 gr de CaCl₂ y se aforó a 500 ml. Se etiquetó y almacenó a 4°C.

Parte B

Se disolvieron 1.5 gr de Na₂HPO₄. 12H₂O en 400 ml de agua desionizada. Se agregaron 0.6 gr de KH₂PO₄ y se aforó a 500 ml con agua desionizada. Se etiquetó y almacenó a 4°C.

Preparación de la levadura

Se suspendieron 125 gr de *Sacharomyces cerevesiae* en 750 ml de agua desionizada, posteriormente se colocó en un baño de agua hirviendo por 5 min, se enfrió y se centrifugó a 5000 rpm por 1 hora, se removió el sobrenadante y se filtró. Finalmente se esterilizó a 15psi por 3 min, se enfrió a temperatura ambiente. Se guardó en tubos estériles, se etiquetó y almacenó a 4°C. Para volúmenes mayores o menores, dependiendo de la cantidad de levadura a preparar se hace la conversión.

Preparación Glucosa 0.5%:

Se tomaron 50 gr de D- glucosa y se diluyeron en 100 ml de agua destilada.

Preparación del rojo de fenol al 0.5%:

Se molieron 2.5 gr de rojo de fenol en un mortero con adición sucesiva NaOH 0.1N, hasta 75 ml pueden ser agregados. Se aforó a 500 ml con agua desionizada y se refrigeró a 4°C toda la noche, se filtró y ajustó el pH a 7.0. Se esterilizó a 15 psi por 3 min. Se dejó enfriar, se etiquetó y almacenó a 4°C.

2.- Cultivo de la cepa.

Se tomó un criovial de la cepa J NCTC 10110.

Para probar la viabilidad de la cepa se sembró inicialmente en tubos de 5 ml de medio líquido 0.5 ml de la cepa en cada tubo.

Se colocaron a 37°C bien cerrados y se dejaron por un periodo de 7 a 15 días. Pasado este tiempo se revisaron y se determinó de acuerdo a las características del medio y sus cambios de color si existía la presencia de *M.h.*

Posteriormente se colocó 0.5 ml de medio de cada uno de los tubos sembrados en cajas de petri con medio Friis y se dejaron a 37°C por el mismo periodo de tiempo (debido a que *M.h.* crece muy lentamente en el medio, el periodo de incubación puede variar).

Después del tiempo de incubación, se observaron las cajas de petri sembradas y se determinó la presencia de *M.h.* por las características de las colonias.

3.- Verificación del estado y pureza de la cepa.

Se tomaron en cuenta las características típicas de las colonias en medio sólido, tiempo de crecimiento y cambios de coloración en el medio líquido.

Se realizó la prueba de Dependencia de Esteroles que diferencía a *Mycoplasma* de otros *Mollicutes*:

La prueba se hizo en medio sólido Friis, los discos utilizados fueron de papel de 6 mm de diámetro impregnados con 0.025 ml de una solución etanólica de digitonina al 1.5%, la cual se preparó colocando 1.5 gr de digitonina en 100 ml de alcohol etílico.

Los discos de digitonina se colocaron en la superficie del medio después de que fue sembrado. La sensibilidad está indicada por una zona clara de inhibición que mide aproximadamente 4-5 mm del centro del disco a la zona de crecimiento del microorganismo.

Para corroborar que se estaba trabajando con la cepa de referencia de *M.h.* se realizó un análisis a través de PCR en los laboratorios AVIMEX S.A. de C. V.

4.- Producción masiva de la cepa (biomasa).

Para determinar el día en el cual se debían retirar los medios de la incubadora y así obtener la biomasa, se hizo una curva de crecimiento. Debido a las características de crecimiento de *M.h.* se decidió hacer varias diluciones 1:10 del medio sembrado, cada dilución se sembró en medio sólido, se incubó por 3 días, cada placa fue observada en el microscopio estereoscópico, aquella dilución en la cual las colonias podían ser contadas se tomó para dar seguimiento al conteo por los siguientes 21 días. El conteo de colonias se efectuó en los días 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 post inoculación.

Después de saber los días en los cuales se tenía el pico máximo de producción de *M.h.* y antes de realizar la producción masiva de la cepa, se realizaron las pruebas de esterilidad para los medios sembrados, tomando 0.5 ml del medio sin

centrifugar y colocándolos en placas de agar sangre, se dejaron incubar por 12 a 48 horas a 37°C y se observaron para determinar si existe contaminación o no.

Siguiendo la metodología del paso 1, se prepararon los medios de cultivo en diferentes cantidades para llevar a cabo la producción masiva de la cepa de *M.h.*

La prueba de esterilidad de los medios se siguió realizando cada vez que se obtenía biomasa.

5.- Preparación de las muestras de suero y del antígeno para la prueba de Coagulación.

La preparación del antígeno se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por Morton 1966, Kende 1969 y Slavik y Switzer 1979, con algunas modificaciones:

Preparación de la muestras de suero:

Se contó con un total de 100 sueros (63 positivos y 37 negativos a anticuerpos contra *M.h* identificados por la prueba de ELISA de bloqueo), se hicieron alícuotas de cada uno y se congelaron a -20°C. Antes de correr la prueba cada suero se inactivó por 30 min a 56°C para evitar reacciones cruzadas con las proteínas de complemento del suero y poder ser usados en la prueba.

Antígeno:

Después del cultivo, las células se concentraron por centrifugación a 12000 rpm/45 min. Posteriormente las células se resuspendieron en 12 ml de NaCl al 0,85% y se centrifugaron a 2500 rpm (1300 x g) durante 45 min las células se

resuspendieron nuevamente en NaCl al 0,85% a una concentración de 1:40 y se congelaron y se almacenaron a -70°C .

La suspensión se calentó durante 30 min a 52°C y se procedió a determinar su concentración proteica.

Determinación de proteína por el método de Bradford:

Es un método basado en el uso del colorante Azul brillante de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue G-250, también Serva Blue), el cual se une a las proteínas en una solución ácida, existe en dos formas una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante, causando un cambio en la longitud de onda de absorción máxima del colorante, de 465 nm a 595 nm. Este método es sensible (1-15 μg), simple, rápido, barato y pocas sustancias interfieren en su determinación. Entre las sustancias que interfieren están los detergentes y las soluciones básicas. Para la determinación de la concentración de proteínas se realiza la lectura a 595 nm.

Se preparó una curva de calibración utilizando la solución stock de albúmina sérica bovina (BSA) Fraction V, Sigma Chemical, a una concentración de 1 mg/ml, como a continuación se describe:

1. Se prepararon 73 tubos de ensaye de 7 ml.
2. Se utilizó un tubo como blanco, 30 tubos para la muestra y 42 tubos para la curva (se hicieron tres repeticiones para la elaboración de la curva).
3. A los tubos numerados del 1 al 7 y a los tubos de la muestra se les agregó agua desionizada y la solución stock (Std) en las cantidades como las que en el cuadro 2 y 3 se describen (todo se manejó por triplicado):

CUADRO 2. Curva Patrón de Albúmina:

	Blanco	Curva estándar						
		1	2	3	4	5	6	7
Agua (μl)	1000	995 (2985)	990 (2970)	980 (2940)	960 (2880)	940 (2820)	920 (2760)	900 (2700)
Std mgml-1 (μl)	0	5 (15)	10 (30)	20 (60)	40 (120)	60 (180)	80 (240)	100 (300)

CUADRO 3. Diluciones de la muestra

Agua (μl)	999.5 (2998.5)	999 (2997)	995 (2985)	990 (2970)	985 (2955)
Muestra (μl)	0.5 (1.5)	1 (3)	5 (15)	10 (30)	15 (45)

4. Se colocaron en otros tubos de ensayo 800 (2400) μl de cada mezcla.
5. Se adicionaron 200(600) μl del Reactivo de Bradford y se mezclaron por agitación.
6. Se dejaron incubar todos los tubos a temperatura ambiente por 5 min.
7. Cada tubo se leyó en un espectrofotómetro BECKMAN COULTER DU800 a 595 nm.
8. Se anotaron los resultados y se graficaron (Inga et al., 2007; Fernández y Galván 2013).

Preparación del Reactivo de Bradford:

Se preparó, con algunas modificaciones, de acuerdo a las cantidades mostradas en el cuadro 4:

CUADRO 4. Componentes del Reactivo de Bradford.

Azul de Coomasie G-250	5 mg
Etanol	2.5 ml
Ácido Fosfórico	5 ml
Agua	Hasta 50 ml

Cada uno se mezcló en el orden indicado, se disolvió por agitación y a continuación se filtró (Fernández y Galván 2013).

Sensibilización de las partículas de látex:

Las partículas de látex de 1 μ de tamaño, se diluyeron 1:5 en una solución de agua desionizada y se almacenaron durante un par de semanas a 4° C.

Se preparó una solución amortiguadora de glicina (SAG) a pH 8.2, disolviendo 3.750 g de glicina y 2.925 g de NaCl en 500 ml de agua desionizada, ajustando el pH a 8,2 con NaOH 1N y se esterilizó por filtración. También se preparó una solución stock de albúmina sérica bovina (BSA) (Fracción bovina V) 1:5: disolviendo 1g de la albúmina en 5ml de agua desionizada y se almacenó a 4 ° C.

Antes de realizar la reacción de aglutinación, la BSA se añadió a la solución tampón de glicina en una concentración de 1 ml de la 1:5 BSA por cada 100 ml de SAG para mantener a *M.h.*

Se tomaron 0,4 ml de la dilución 1:5 de látex y se añadieron a 1.0 ml de la solución de *M.h.* estandarizado, posteriormente se incubó a temperatura ambiente durante al menos 30 min y se llevó a un volumen de 10 ml con la solución de glicina y albúmina. Después se incubó durante 10 a 15 min a temperatura ambiente con agitación ocasional. Se volvió a centrifugar y se le agregaron 10 ml de amortiguador de citratos, el cual se preparó de la siguiente manera:

Se preparó un total de 100 ml y se utilizaron dos soluciones: solución A (se colocaron 2.101 gr de ácido cítrico en 100 ml de agua desionizada), Solución B (se colocaron 2.941 gr de citrato de sodio en 100 ml de agua desionizada). De la solución A se tomaron 40 ml y de la solución B se tomó 1 ml, se aforó con agua desionizada a 100ml.

Para sensibilización durante la noche, el látex y la mezcla de antígeno se mantuvieron a 4 ° C con mezclado constante y llevado a volumen de 10 ml con el amortiguador de citratos al día siguiente.

Para corroborar la unión del látex y el antígeno se utilizó la técnica de Microscopía electrónica de Transmisión, al igual y como lo menciona Morton en 1966, la cual se describe a continuación.

Microscopía Electrónica de Transmisión:

El microscopio electrónico de transmisión es un equipo complejo que funciona al alto vacío (Figura 6), en donde la imagen está dada por los electrones transmitidos a través de la muestra, para esto se utilizan colorantes electrónicos que ayudan a mejorar el contraste de las muestras, uno de ellos es el ácido fosfotúngstico, el cual se caracteriza por resaltar las estructuras proteínicas. A esta técnica de tinción se le conoce como Tinción Negativa.

Cada una de las rejillas utilizadas en esta técnica están recubiertas con una membrana conocida como Membrana de Formvar, cuya función principal es la adsorción de las partículas que se van a observar (González et al., 2003).

Técnica de Tinción Negativa:

Una gota de suspensión de microorganismos (*M.h.*) se depositó sobre un papel parafilm (Figura 6), y se colocaron 2 rejillas con membrana para que se adsorbiera la muestra durante 20 min, posteriormente se tomaron las rejillas y el exceso se absorbió con papel filtro, enseguida se colocó una gota de ácido fosfotúngstico en papel parafilm y las rejillas fueron colocadas en ellas durante un periodo de 2 min, finalmente las rejillas se recogieron y se absorbió el exceso de colorante, se dejaron secar en estufa a 35°C (Protocolo tomado de Gonzáles et al., 2003).



Figura 6. Técnica de tinción negativa y microscopio electrónico de transmisión.

Las muestras fueron observadas y fotografiadas en el microscopio de transmisión JEOL JEM-100s.

Se hicieron otras pruebas en la cuales se utilizaron diferentes soluciones (cloruro de sodio y agua desionizada) para fijar al látex con el antígeno y la unión se observó con microscopía electrónica de transmisión.

6.- Realización de la prueba de ELISA de Bloqueo con el KIT (*Mycoplasma hyopneumoniae* ELISA) OXOID Laboratories:

En la primer placa (blanca) se colocaron 135 μ l de diluyente de muestras en todos los pocillos destinados a las muestras, control positivo, control negativo y amortiguador (todo se hizo por duplicado). Posteriormente se colocaron 15 μ l de las muestras, control positivo y control negativo a cada uno de los pocillos, no se agregaron muestras o controles a los pocillos asignados para el amortiguador control.

En la segunda placa (transparente) se localizaron el número necesario de pocillos recubiertos de antígeno monoclonal y se transfirieron 100 μ l de cada muestra, controles y amortiguador. Todo se incubó durante 90 min a 20-30 ° C sin agitación. Se añadieron 100 μ l de conjugado a cada pocillo y sin mezclar se incubó a 20-30 ° C durante 15 min, posteriormente se hizo un lavado la solución tampón de lavado diluida recién preparada, se hicieron cuatro ciclos de lavado.

Se agregó 100 μ l de sustrato a cada pocillo, se incubaron 20-30 ° C sin agitación durante 10 min y finalmente se añadieron 100 μ l de la solución de parada a cada pocillo asegurando una buena mezcla en los pocillos.

Se mezcló el contenido y los pocillos se leyeron fotométricamente dentro de los 30 min después de la adición de la solución de parada a una absorbancia de 450 nm.

El punto de corte para esta prueba es de 2.5 de densidad óptica.

7.- Desarrollo de la Prueba de Co-aglutinación con sueros de diferentes granjas:

Antes de realizar la prueba, a la suspensión de látex sensibilizado se le agregó colorante rosa de bengala (sal disódica, pureza 93%, Aldrich) en una cantidad de 80 μ l.

De cada una de las alícuotas de los sueros, se colocaron, en una placa especialmente diseñada para esta prueba, 20 μ l de suero problema, 20 μ l de las partículas de látex sensibilizadas, además de un control positivo (suero ya identificado como positivo a *M. h.* más la suspensión de látex sensibilizado) y control negativo (suspensión de látex sensibilizado) en las mismas cantidades. El contenido de las placas se agitó por 5 a 10 min y la reacción de aglutinación se observó a simple vista (Miranda *et al.*, 2009).

De los controles positivos y negativos se hicieron varias repeticiones en dos placas diferentes, para ver si existían variaciones.

Los resultados obtenidos se midieron como aglutinación positiva cuando se observó la presencia de pequeños grumos y aglutinación negativa cuando los grumos no se observaron.

8.- Determinación de la sensibilidad y especificidad de la prueba de Co-aglutinación y análisis de resultados.

Se hizo una comparación de resultados en cuanto a positivos y negativos con la prueba de ELISA de Bloqueo para tener un estimado de la especificidad relativa y sensibilidad relativa. De esta forma se determinó qué tan funcional puede ser la prueba para el diagnóstico de *M.h.*

Se utilizó el programa EPIDAT 3.1 el cual nos ayuda a determinar los parámetros antes mencionados con los siguientes cálculos:

Sensibilidad Relativa: $VP / (VP + FN) \times 100\%$

Especificidad Relativa: $VN / (VN + FP) \times 100\%$

Donde:

- VP (verdaderos positivos)
- VN (verdaderos negativos)
- FN(falsos negativos)
- FP (falsos positivos) (Rai *et al.*, 2003; Akhoundi *et al.*, 2013).

RESULTADOS

Se logró verificar la presencia de la cepa y estandarizar la metodología en la elaboración de los medios de cultivo líquidos y sólidos.

Los medios fueron puestos a prueba de esterilidad y posteriormente se cultivó la cepa. Se identificó con éxito al microorganismo conocido como *M.h.*, identificándolo por las características morfológicas de las colonias en el medio solido (Figura 7) y apreciando los cambios de coloración en los medios de cultivo líquido como lo han reportado en la literatura (Figura 8).

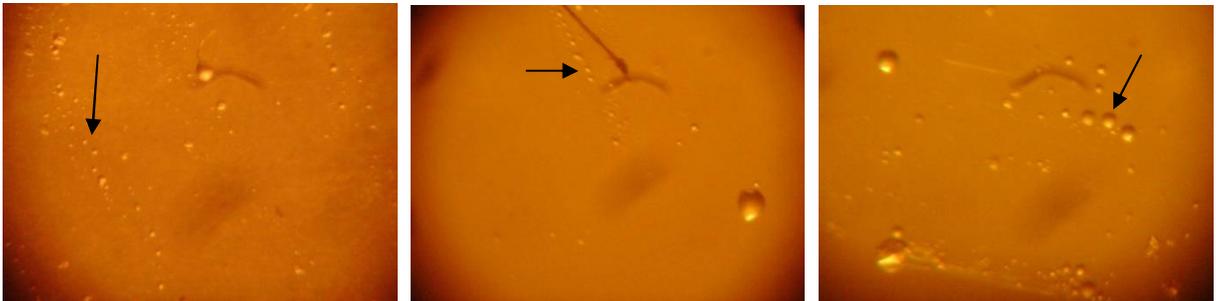


Figura 7. Colonias típicas de *Mycoplasma hyopneumoniae* en diversos estadios de crecimiento (flechas).



Figura 8. Cambios de coloración medio líquido en distintas fases de crecimiento.

Al realizar la prueba de dependencia de esteroides, se observó la formación de los halos de inhibición alrededor de los discos colocados en los medios sembrados (Figura 9), con lo cual se corroboró la presencia de microorganismos pertenecientes a la familia *Mycoplasmataceae*.

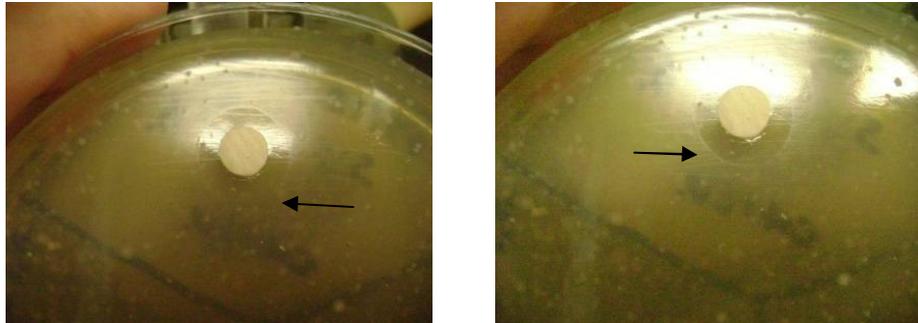


Figura. 9. Prueba de dependencia de esteroides. Formación del halo de inhibición (Flechas).

Se corroboró que fuera *M.h.*, a través de la prueba de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), la cual dio positiva.

Con relación a la curva de crecimiento, la dilución a la cual se pudo realizar el conteo fue 10^7 . El conteo de colonias determinó que el crecimiento inicia el día 3 y el pico máximo es el día 7 post inoculación, las colonias observadas presentaban las características típicas de *M.h.*: colonias ligeramente convexas en su superficie, desprovistas de protuberancia central típica, observándose no como huevo estrellado, sino como algunos autores lo mencionan “como gotas de rocío”. Después del día 7, el número de colonias empieza a decrecer y sus características morfológicas se ven modificadas, el medio además también cambia de coloración (rojo a naranja), pierde los nutrientes requeridos por el microorganismo y los productos de secreción de *M.h.* hacen al medio inadecuado para su reproducción (cuando la coloración del medio es amarilla).

Para realizar la producción de la biomasa se colocaron 5 ml de medio sembrado en 400 ml de medio líquido recién preparado. Se dejó en la incubadora a 37°C.

Al realizar la prueba de esterilidad de los medios sembrados con *Mycoplasma*, no se observó crecimiento alguno en medio líquido y en las placas de Agar sangre, por lo tanto se procedió con la producción de la biomasa. El mismo resultado fue obtenido cada vez que se obtenía biomasa y se realizaba la prueba de esterilidad con agar sangre.

Se logró obtener una buena cantidad de biomasa, y al llevar a cabo la determinación de la proteína mediante la técnica de Bradford los resultados indicaron que se tenían 258 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteína, que se obtuvo de una cantidad total de 4 litros de medio de cultivo. Al realizar los cálculos para conocer la cantidad de proteína por pocillo se determinó que teníamos 23 μg de proteína.

Siguiendo el protocolo para la sensibilización de las partículas de látex con el antígeno, se determinó la unión de estos mediante la técnica de microscopía electrónica de transmisión.

Inicialmente se tomaron una muestra de la mezcla látex-antígeno sin haber realizado el proceso de sensibilización de las partículas de látex, en la figura 10 se muestra a las partículas de látex y un microorganismo compatible con *M.h.* aún sin unirse:

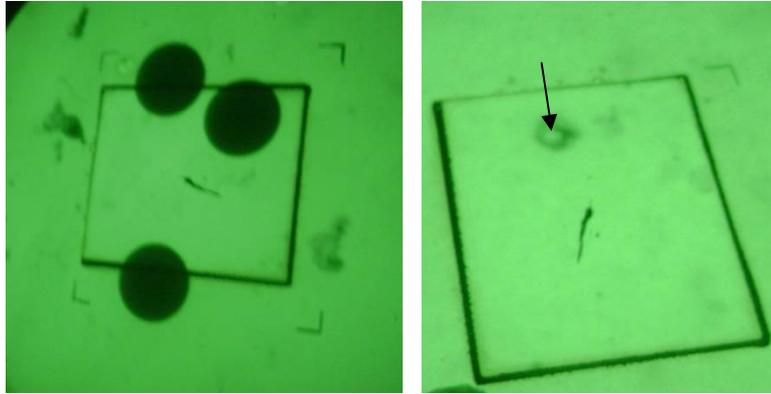


Figura 10. Partícula de látex (círculos negros) y microorganismo compatible con *Mycoplasma hyopneumoniae* (flecha). Fotografías tomadas a 10 000 aumentos.

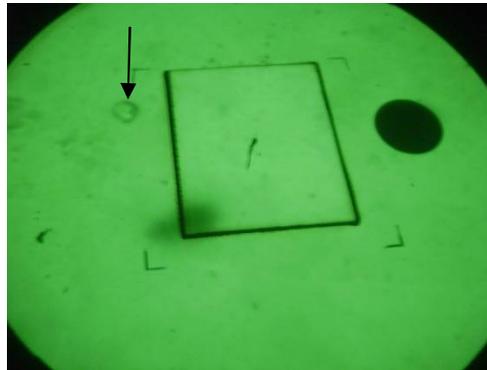


Figura 11. Comparación de la partícula de látex (circulo negro) con el microorganismo compatible con *Mycoplasma hyopneumoniae* (flecha). Fotografía tomada a 10 000 aumentos.

Como se puede observar la partícula de látex ($1 \mu\text{m}$) es aún más grande que *M.h.* (Figura 11); este microorganismo mide $0.2 \mu\text{m}$ ($0.3\text{-}0.8 \mu\text{m}$) de diámetro.

Posteriormente se realizó el proceso de sensibilización y se logró observar la unión entre la partícula de látex y *M.h.* (Figura 12) con lo cual procedimos a la realización de la prueba de Co-aglutinación.

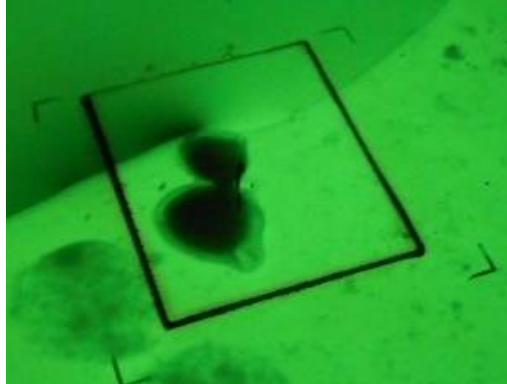


Figura 12. Unión partícula de látex y *Mycoplasma hyopneumoniae*. Fotografía tomada a 10 000 aumentos.

Al utilizar otras soluciones en la preparación de la prueba, se observó que al usar el cloruro de sodio las partículas de látex se aglutinaron entre ellas, llegando al grado de romper la membrana de la rejilla. En caso contrario el agua desionizada no ocasionó reacción alguna.

Finalmente se agregó el suero a las partículas de látex sensibilizadas y se observó mediante microscopía electrónica de transmisión la unión de *M.h.*, látex, anticuerpos y obtuvimos las siguientes fotografías (Figura 13):

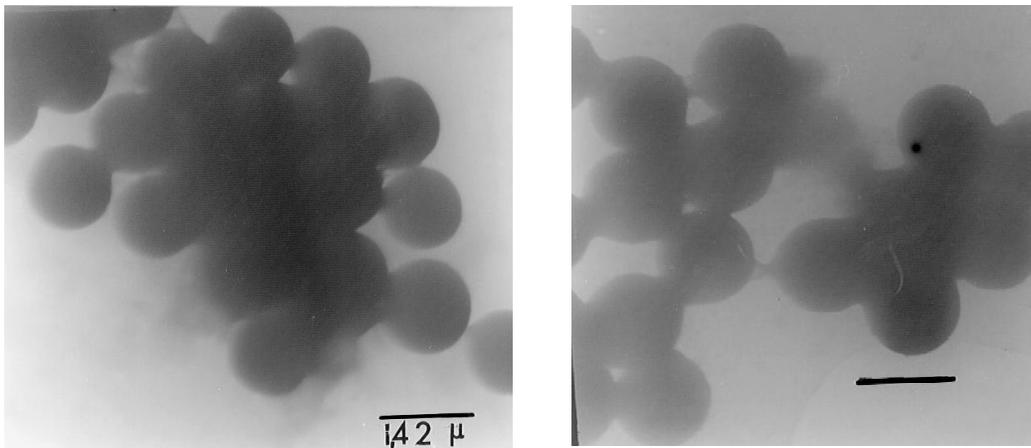


Figura 13. Reacción de aglutinación observada por Microscopía Electrónica de Transmisión. Fotografía tomada a 10 000 aumentos.

Inicialmente se llevó a cabo la prueba de ELISA de Bloqueo con cada uno de los sueros y se obtuvieron los siguientes resultados (Cuadro 5):

CUADRO 5. Resultados Prueba de ELISA.

SUEROS POSITIVOS	SUEROS NEGATIVOS
37	63

Posteriormente, ya identificados los sueros positivos y los sueros negativos, se procedió con la prueba de Co-aglutinación con la que se obtuvo lo mostrado en el cuadro 6:

CUADRO 6. Resultados Prueba de Co-aglutinación.

PARÁMETRO	SUEROS
Positivos	22
Negativos	53
Falsos Positivos	10
Falsos Negativos	15
TOTAL	100

Con la prueba de Co-aglutinación se lograron identificar de un total de 100 sueros, 32 como positivos, 68 como negativos. La reacción de aglutinación se pudo observar después de 5 a 10 min y de una agitación constante (Figura 14), como a continuación se muestra:

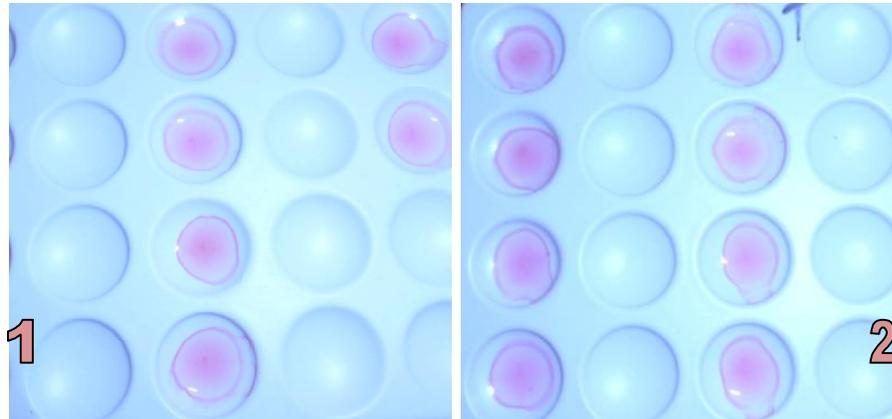


Figura 14. Reacción de aglutinación. 1) Sueros identificados como negativos, 2) sueros identificados como positivos.

En las placas con los controles positivos la reacción observada fue un cúmulo de gránulos que al movimiento de la placa se observaban claramente y en los controles negativos no se observaba reacción alguna.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos con las dos pruebas se procedió a determinar la sensibilidad y especificidad relativas de la prueba (Cuadro 7) con el programa EPIDAT 3.1 y siguiendo la fórmula propuesta por Rai y colaboradores en el 2003 y Akhoundi y colaboradores en el 2013:

CUADRO 7. Análisis Prueba de Co-aglutinación.

Pruebas diagnósticas simples			
Nivel de confianza:	95,0%		
	Prueba de referencia		
Prueba diagnóstica	Enfermos	Sanos	Total
Positivo	22	10	32
Negativo	15	53	68

Total	37	63	100
	Valor	IC (95%)	
Sensibilidad (%)	59,46	42,29	76,63
Especificidad (%)	84,13	74,31	93,94
Índice de validez (%)	75,00	66,01	83,99
Valor predictivo + (%)	68,75	51,13	86,37
Valor predictivo - (%)	77,94	67,35	88,53

Este análisis (Cuadro 7), nos refleja que la prueba de Co-aglutinación presenta una sensibilidad relativa del 59.46% (de 37 sueros positivos identificados por la prueba de ELISA, la prueba de Co-aglutinación identificó 22) y una especificidad relativa del 84.13% (de 63 sueros negativos identificados por la prueba de ELISA, la prueba de Co-aglutinación identificó 53), un valor predictivo positivo de 68.75% (de los sueros identificados como positivos existe la probabilidad que 15 sean de animales que presenten la enfermedad) y un valor predictivo negativo de 77.94% (de los sueros identificados como negativos existe la probabilidad que 41 sean de animales que no presenten la enfermedad).

DISCUSIÓN

La enfermedad denominada Neumonía Enzoótica hasta nuestros días continúa ocasionando grandes pérdidas económicas a nivel nacional e internacional; Han sido muchos los esfuerzos que se han hecho para poder controlarla y sobre todo evitar que se presente en las piaras. Se han desarrollado medidas profilácticas para poder lograrlo (vacunas y de buenas prácticas de manejo) con buenos resultados, sin embargo, la enfermedad se sigue presentando, por lo que las técnicas de diagnóstico se han vuelto una herramienta muy valiosa en su control (Cruz *et al.*, 2003; Bachmann, 2004; Abeledo *et al.*, 2005; Okada *et al.*, 2005; Luciano *et al.* 2009; Zhi-Xin *et al.*, 2010).

El diagnóstico molecular y serológico han presentado buenos resultados y han demostrado ser las más útiles. Las pruebas moleculares están siendo reconocidas como las mejores en cuanto a diagnóstico se refiere, sin embargo, la gran mayoría son un tanto costosas y sólo pueden ser llevadas a cabo por personal y con equipo especializado. La mayoría de las pruebas serológicas son más prácticas y ofrecen excelentes resultados, algunas se han desarrollado para ser aplicadas a nivel de campo y obtener resultados de forma sencilla y rápida (OIE, 2013). Pocas de estas pruebas se realizan en México, y las que más se utilizan son para estudios de investigación que para diagnóstico, debido principalmente a la falta de infraestructura, equipo, y personal capacitado, que sólo los laboratorios de las Universidades e Institutos poseen (Ciprián *et al.*, 1990).

El aislamiento del microorganismo en medio de cultivo se ha logrado con éxito en el medio Friis; esta metodología se considera el estándar de oro en cuanto al diagnóstico se refiere, por lo tanto es vital estandarizarlo. En este estudio se logró elaborar el medio aplicando algunas modificaciones a la metodología recomendada por Whitford y colaboradores en 1994, se adicionaron algunos elementos que enriquecieron el medio de cultivo ayudándonos a que el

crecimiento de *M. h.* fuera un poco más rápido, quedando esto demostrado en la curva de crecimiento en donde el pico máximo se alcanzó a los 7 días y no hasta los 15 ó hasta 30 días que es el tiempo de crecimiento que reportan estos autores.

Debido a que *M.h.* es un microorganismo difícil de aislar y reproducir, se requiere de mucho tiempo para lograrlo y de mucho cuidado ya que si el medio pierde sus propiedades y no se determina el momento óptimo para obtener la mayor cantidad de células, el aislamiento se dificulta. En el 2010 Calus *et al.* desarrollaron un sistema para medir la concentración de células de *M.h.* y el pico máximo de crecimiento que alcanza, demostrando que el método usado rutinariamente en donde el crecimiento se identifica por UCC (unidades cambiantes de color) no es muy útil ya que subestima la concentración celular real. El método propuesto es a base de luminometría y medición de ATP. Ellos obtuvieron que el crecimiento inicia a las 48hrs y el máximo crecimiento se obtiene a las 80-100 hrs (3-4 días) post inoculación; en este trabajo se determinó el inicio y pico máximo de crecimiento mediante una curva de crecimiento, se obtuvo que el inicio es al día 3 y el pico máximo se alcanzaba al día 7 post inoculación, además de que después del d. Al comparar los resultados con los obtenidos por Calus *et al.*, el pico máximo de crecimiento se alcanzó pocos días después, esta variación no es muy amplia y no afecta a la cantidad de microorganismos que se pudiesen obtener como biomasa, ya que al día 7 post inoculación, si se resiembran los *Mycoplasmas* obtenidos, la capacidad y velocidad de crecimiento en el medio no se ve afectada. Ellos utilizaron un método que se reconoce como más preciso porque se basa en que la cantidad de ATP producida en el medio, reconociendo que la cantidad de ATP producido es proporcional al número metabolizante de células, sin embargo este método no es tan práctico y se requiere de equipo especializado y un tanto costoso.

En base a lo anteriormente mencionado establecimos que el tiempo de incubación requerido para obtener una concentración de células máxima y evitar la muerte

celular por falta de nutrientes en el medio es de 3-7 días, siendo el día 7 el más recomendable para retirar el medio de la incubadora y obtener una buena cantidad de biomasa, sin tener grandes pérdidas de colonias de este microorganismo.

La técnica de aglutinación ha sido reconocida como la más útil y práctica en cuanto al diagnóstico de enfermedades a nivel de campo se refiere, además de que *in vitro*, ha demostrado ser más práctica y rápida en comparación con otras técnicas como la de Fijación del Complemento, inhibición del crecimiento y precipitación, según los estudios realizados por Morton en 1966.

Esto fue apoyado por Slavik y Switzer en 1979, quienes desarrollaron la técnica de aglutinación en tubo con utilización de partículas de látex para el diagnóstico de *M.h.* Identificaron la presencia de anticuerpos contra este microorganismo desde la semana 2 post inoculación hasta las 24 semanas post inoculación, tomando en cuenta lo anterior, se desarrolló esta técnica con algunas modificaciones que permitieron la utilización de placas y partículas de látex de mayor tamaño facilitando de esta forma la visualización de la reacción de aglutinación sin necesidad de utilizar equipo como la centrifuga y el microscopio. De esta forma, se presenta una opción práctica y sencilla para lograr identificar la presencia de este microorganismo, sobre todo cuando se presentan casos en los que la neumonía persiste y es difícil de controlar.

Los resultados obtenidos en cuanto a la fijación del microorganismo con las partículas de látex y el suero fueron observados mediante microscopía y coincidieron con los resultados obtenidos por Morton en 1966 (Figura 15), quien desarrolló la técnica pero con distintas especies de *Mycoplasma*, las fotografías mostraron la unión de *Mycoplasma* a la partícula de látex y la reacción de aglutinación.

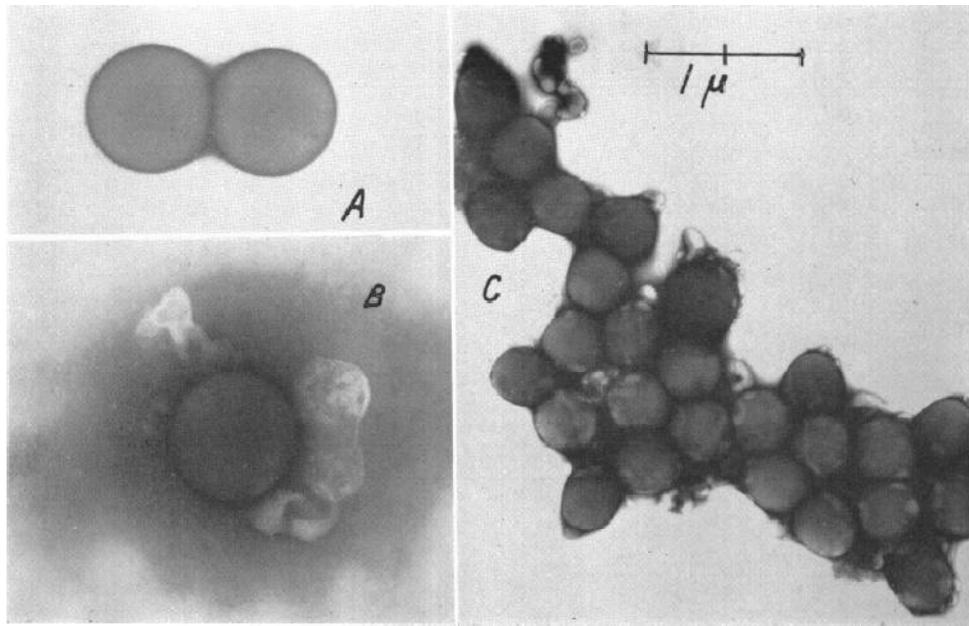


FIG. 2. Electron micrographs: (A) latex particles suspended in GBS with BSA and 1:160 dilution of rabbit immune serum, the same concentration which produced the reaction pictured in (C); (B) latex particles with adsorbed PPLO cells suspended in the GBS with BSA; (C) small mass of PPLO-adsorbed latex particles agglutinated by 1:160 dilution of rabbit immune serum. The magnification in A and B is twice that in C. The magnification in C is approximately 10,000 × as indicated by the bar.

Figura 15. Reacción de aglutinación demostrada por Morton, 1966.

No se recomienda usar otras soluciones en la preparación de la prueba como el cloruro de sodio, debido a que le provee cierta carga a las partículas de látex que las hace se aglutinen entre ellas, ocasionando la ruptura de la membrana de la rejilla. Caso contrario sucede si se utiliza el agua desionizada ya que no hubo reacción alguna, por lo tanto puede ser utilizada para la prueba.

En cuanto a la identificación de animales positivos y negativos la prueba presentó una sensibilidad relativa del 59.46% y una especificidad relativa del 84.13%, por lo que es más específica que sensible, esto se confirma con su valor predictivo negativo (77.94%), que se basa en la probabilidad que existe de que los individuos con una prueba negativa no tengan realmente la enfermedad, además de que el valor está por encima del valor predictivo positivo (68.75%), el cual se basa en la

probabilidad de que los individuos con una prueba positiva tengan realmente la enfermedad (Greenberg *et al.*, 2005; Gordis, 2005).

Para la identificación de animales infectados con *M.h.* se hace necesaria una prueba más sensible, ya que de no identificarlos implicaría la diseminación de la enfermedad y graves implicaciones productivas y económicas en la granja. Esta prueba puede complementarse utilizando otras pruebas más sensibles para poder llegar a un diagnóstico más preciso, además de que abre la posibilidad de nuevas líneas de investigación en cuanto al perfeccionamiento de la técnica y la utilización de antígenos específicos y otros elementos que faciliten la observación de la reacción de aglutinación, así mismo se requieren de más estudios para poder utilizarla con sangre completa.

Actualmente no hay ningún estudio que se base en la utilización de la reacción de aglutinación directa y que se utilice en campo para poder diagnosticar la presencia de *M.h.* en las granjas, las comúnmente utilizadas requieren ser analizadas en un laboratorio, presentan buenos índices de sensibilidad y especificidad sin embargo no son prácticas, es por ello que desarrolló esta prueba para poder utilizarla a nivel de campo, ya que la reacción de aglutinación es observada a simple vista, por lo tanto el productor, con la conveniente explicación del uso e interpretación de la prueba, puede utilizarla sin ningún inconveniente.

CONCLUSIONES

1. Se logró desarrollar una prueba práctica y fácil de realizar, para el diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae* a nivel de campo.
2. Se identificó a *Mycoplasma hyopneumoniae* a partir de cepas de referencia.
3. La prueba diagnóstica se elaboró a partir de la técnica de aglutinación, utilizando partículas de látex como elemento facilitador del diagnóstico.
4. Se logró probar la utilidad de la técnica a través de la utilización de sueros de animales de varias granjas y la comparación de los resultados con la técnica de ELISA; se encontró que presenta una sensibilidad relativa del 59.46% y una especificidad relativa del 84.13%, con lo cual se determinó su capacidad de identificar animales infectados y no infectados.
5. La técnica ofrece buenas perspectivas en cuanto a la identificación de animales infectados con *Mycoplasma hyopneumoniae*, sin embargo, deben ser aplicadas algunas modificaciones y mejoras para poder utilizarla a nivel de campo.

REFERENCIAS

Abeledo MA, Ruano MP, Vega E, Lobo E, Rueda D. Detección de anticuerpos frente a *Mycoplasma hyopneumoniae* en crías porcinas mediante un ELISA competitivo (civtestsis *Mycoplasma hyopneumoniae*). *Rev. Salud Anim.* 2005; 27 (1): 21-25.

Abiven P, Blanchard B, Saillard C, Kobisch M, Bove JM. A specific DNA probe for detecting *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected piglets. *Molec. and Cell. Prob.* 1992; 6: 423-429.

Acosta BM, Codina GMG, Matas AL, Meseguer PMA. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Mycoplasma spp.* y *Ureaplasma spp.* Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica [versión electrónica]. 2011. (Citado diciembre 2013). Disponible desde: URL: <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia40.pdf>

Akhoundi B, Mohebalı M, Shojaee S, Jalali M, Kazemi B, Bandehpour M, *et al.* Rapid detection of human and canine visceral leishmaniasis: Assessment of a latex agglutination test based on the A2 antigen from amastigote forms of *Leishmania infantum*. *Experim. Parasitol.* 2013; 133: 307-313.

Aldaz IA. Enfermedades respiratorias del cerdo: algunos aspectos prácticos a considerar en el diagnóstico y control para la resolución de casos clínicos. *Anaporc. Rev. de Porcicult.* 2002; 221: 78-102.

Ameri M, Zhou E, Hsu WH. Western blot immunoassay as a confirmatory test for the presence of anti-*Mycoplasma hyopneumoniae* antibodies in swine serum. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2006; 18:198–201.

Andrada M., Fernández, A., Del Pozo, M. y Sánchez – Vizcaíno, J. Curso digital de enfermedades infecciosas porcinas. Cap. 10: Neumonía Enzootica. Universidad Complutense de Madrid, España. [En línea]. 2003 (citado agosto 2013). Disponible desde: URL: <http://www.sanidadanimal.info/cursos/curso/>.

Armstrong CH, Freeman MJ, Sands-Freeman L, Lopez-Osuna M, Young T and Runnels L. Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay and the indirect hemagglutination and complement fixation tests for detecting antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Can. J. Comp. Med.* 1983; 47: 464-470.

Bachmann CV. Dinámica de la infección con *Mycoplasma hyopneumoniae* en porcinos provenientes de madres con antecedentes y sin antecedentes de inmunización. Capítulo II (tesis de Licenciatura). Lima. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. [versión electrónica]. 2004. (Citado enero 2013). Disponible desde: URL: http://www.cybertesis.edu.pe/sisbib/2004/bachmann_cv/pdf/bachmann_cv-H.2.pdf

Bai F, Ni B, Liu M, Feng Z, Xiong Q, Xiao S, Shao G. *Mycoplasma hyopneumoniae*-derived lipid-associated membrane proteins induce apoptosis in porcine alveolar macrophage via increasing nitric oxide production, oxidative stress, and caspase-3 activation. *Vet Immunol. and Immunopathol.* 2013; 155: 155-161.

Bentley S, Sebahia M, Crossman L. Enemies within. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005; 3: 8-9.

Bereiter M, Young TF, Joo HS and Ross RF. Evaluation of the ELISA and comparison to the complement fixation test and radial immunodiffusion enzyme assay for detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine serum. *Vet. Microbiol.* 1990; 25: 177-192.

Blanchard B, Vena M, Cavalier A, Lannic J, Gouration J and Kobisch M. Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Microbiol.* 1992; 30: 329-341.

Blood C. y Radostits M. Enfermedades del aparato respiratorio Medicina Veterinaria. Vol. I, Capítulo 10, Capítulo 20: Enfermedades causadas por especies de *Mycoplasma*, Séptima Edición. Madrid, España. Editorial McGraw-Hill Interamericana. 1992: 385-421, 834-851.

Bommeli W y Nicolet J. A method for the evaluation of enzyme-linked immunoassay results for diagnosing enzootic pneumonia in pig herds. *Proc. Int. Symp. World. Assoc. Vet. Lab. Diag.* 1983; 3(2):439-442.

Botero D y Restrepo M. Parasitosis Humanas. Cuarta edición. Editorial Corporación para Investigaciones Biológicas. Bogotá. [Versión electrónica]. 2003 (Citado enero 2013) Disponible en: URL: <http://books.google.com.mx/books?isbn=9589400647>.

Boughton E y Thorns C. *Mycoplasma* Laboratory Handbook. Weybridge, Inglaterra: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Central Veterinary Laboratory. 1976: 26-39.

Calsamiglia M, Jaimes E, Pijoan C. Correlation between the presence of enzootic pneumonia lesions and detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchial swabs by PCR. *Vet Microbiol.* 2000; 76: 299-303.

Calsamiglia M y Pijoan C. Colonization state and calostrical immunity to *Mycoplasma hyopneumoniae* of different parity sow. *Vet. Rec.* 2000; 146: 530-532.

Calus D, Maes D, Vranckx K, Villareal I, Pasmans F, Haesebrouck F. Validation of ATP luminometry for rapid and accurate titration of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Friis medium and a comparison with the color changing units assay. *J. of Microbiol. Meth.* 2010; 83: 335–340.

Choi C, Kwon D, Jung K, Ha Y, Lee Y, Kim O, Park H, *et al.* Expression of inflammatory cytokines in pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Comp. Path.* 2006; 134: 40–46.

Ciprián C. Interacción entre *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Pasteurella multocida* en las neumonías de los cerdos (tesis doctoral) Cuautitlán, Izcalli, México: Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. 1987: 22-34.

Ciprián A, Colmenares G y Mendoza S. La enfermedad en México *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. Compendio sobre *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. Guadalajara (Jalisco) México. Editado por AMVEC, AC. 1990: P: 29-42.

Ciprian C, Mendoza E y Cruz S. Neumonía enzoótica: Etiología, Inmunidad y diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Memorias del tercer ciclo nacional de enfermedades respiratorias del cerdo; 2001; Cuautitlán Izcalli (Estado de México) México. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. 2001.

Ciprián C, Cruz S, Mendoza E. Epidemiología, prevención y control de *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos. Cap. 27. Libro Enfermedades de importancia económica en producción animal por Rodríguez, V. R. I. Mérida Yucatán, México. Editorial Mc Graw Hill. 2005: 449-477.

Clark L. *Mycoplasma hyopneumoniae*: Serology/Vaccinology. Proceedings AASV.30th Annual Meeting; 1999 February 28-March 2; St Louis, Missouri: American Association of Swine Practitioners. 1999.

Cruz S. Evaluación de dos inmunógenos de *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos convencionales (tesis de maestría) Cuautitlán, Izcalli (Estado de México) México: Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, 1991: 1-18.

Cruz S, Tórtora P, Vega M, Romero R, Mendoza E, Ciprián C. Cinética de la infección experimental en cerdos con *Mycoplasma hyopneumoniae* usando inmunofluorescencia. *Vet. Mex.* 2003; 34(1): 61-68.

DeBey MC. and Roos RF. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infec. and Immun.* 1994; 62 (12): 5312-5318.

Djordjevic SP, Eamens GJ, Romalis LF, Saunders MM. An improved enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of porcine serum antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Microbial.* 1994; 54: 23-34.

Dubarry J. Tuberculosis bovina: valoración de la inmunohistoquímica como método de diagnóstico complementario. *Cien. Vet.* 2005; 7(1): 82-86.

Dubosson CR, Conzelmann C, Miserez R, Boerlin P, Frey J, Zimmermann W, Häni H, Kuhnert P. Development of two real-time PCR assays for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in clinical samples. *Vet. Microbiol.* 2004; 102: 55–65.

Eichwald C, Illner F, Trolldenier H. Micoplasmosis de los animales. Zaragoza España: Editorial Acribia, 1973: 15-21.

Epperson B. El valor del sistema todo dentro todo fuera y destete temprano Universidad de Dakota del Sur. 2002 (citado diciembre 2013). Disponible en: URL: http://www.veterinaria.org/asociaciones/vet-uy/articulos/artic_porc/001/porc001.htm

Espinet B, Salido M, Solé F. Técnicas de citogenética molecular y sus aplicaciones. Laboratorio de Citogenética y Biología Molecular, Departamento de Patología. Barcelona. 2012 (citado noviembre 2013). Disponible en: URL: http://www.cekm.unlugar.com/tec_cit_mol.pdf

Feld N, Qvist P, Ahrens P, Friis N. and Meyling A. A monoclonal blocking ELISA detecting serum antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol.* 1992; 30: 35-46.

Feng Z, Guo-qing S, Mao-jun L, Xu-su W, Yong-qi Z and Yuan G. Immune responses to the attenuated *Mycoplasma hyopneumoniae* 168 strain vaccine by intrapulmonic immunization in piglets. *Agric. Scienc. in China.* 2010; 9(3): 423-431.

Fernández, C. (2012) Amplificación de ácidos nucleicos para el diagnóstico de infecciones por *Mycoplasma* y *Ureaplasma* de interés clínico en Cuba (tesis doctoral) La Habana, Cuba: MINSAP Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". 2010 (citado enero 2013) Disponible en: URL: <http://tesis.repo.sld.cu/478/1/FernandezMolinaC.pdf>.

Fernández E y Galván A. Métodos para la cuantificación de proteínas. Rabanales, Córdoba: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Córdoba. 2013 (citado octubre 2013) Disponible en: URL: <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/27%20M%C3%89TODOS%20PARA%20LA%20CUANTIFICACI%C3%93N%20DE%20PROTE%C3%8DNAS.pdf>

Friis N. The SPS and Digitonina test applied to porcine *Mycoplasmas*. *Act. Vet. Scand.*, 1975; 16: 474-476.

Fuentes A, Castiñeiras L, Queraltó C. Bioquímica clínica y patología molecular. Vol I, Segunda Edición, Barcelona, España: Editorial Reverte, S.A. 1998 (citado mayo 2013) Disponible en: URL: http://books.google.com.mx/books?id=cKGyh_81v-oC&pg=PA378&lpg=PA378&dq=caracteristicas+de+las+particulas+de+latex&source=bl&ots=s_iE-zsxR3&sig=T0MAhSOs-IG1SsNGa2MWvyQK-bw&hl=es-419&sa=X&ei=Ux16U9SfEliaqAbh8IHwCg&ved=0CB8Q6AEwAA#v=onepage&q=caracteristicas%20de%20las%20particulas%20de%20latex&f=false

González G, Ruiz V, Hernández B. Guía de microscopía electrónica. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlán, Izcalli (Estado de México). Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. 2003: 15-28.

Gordis L. Epidemiología. 3ra Edición. Madrid. España: Editorial ELSEVIER. 2005: 71-94.

Greenberg R, Daniels S, Flanders W, Eley J, Boring J. Epidemiología médica. 4a Edición. México D.F.: Editorial Manual Moderno. 2005: 89-101.

Herrero U. Procedimientos en virología médica. Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica. 2004 (citado enero 2013) Disponible en: URL: <http://books.google.com.mx/books?id=tvCKhsPLZlC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>

Howard C. y Taylor G. Immune responses to *Mycoplasma* infections of the respiratory tract. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 1985; 10: 3-32.

Inga P, Santibáñez L, Maxy S. Cuantificación de Proteínas. 2007 (citado agosto 2013) Disponible en: URL: <http://www.molecularstation.com/es/protein/bradford-protein-assay-protocol/>

Ingraham J e Ingraham C. Introducción a la microbiología. Barcelona: Editorial Reverte S. A. 1998 (citado enero 2013) Disponible en: URL: <http://books.google.com.mx/books?isbn=8429118713>

Jones GF, Rapp–Gabrielson V, Wilke R, Thacker EL, Thacker BJ, Gergen L, Sweene D, Wasmoen T. Intradermal vaccination for *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. of Swine Health and produc.* 2005; 13 (1): 19-27.

Kende M. Antibody response of animals to *Mycoplasma pneumoniae* measured by latex agglutination. *Applied Microbiol.* 1969; 17 (2): 275-279.

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

Kokotovic B, Friis N, Jensen J, Ahrens P. Amplified-fragment length polymorphism finger printing of *Mycoplasma* Species. *J. of clinic. Microbiol.* 1999; 37 (10): 3300–3307.

Le Carrou J, Laurentie M, Kobisch M, Gautier-Bouchardon A. Persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected pigs after marbofloxacin treatment and detection of mutations in the par C gene. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 2006; 50: 1959-1966.

León EA, Made F, Taylor NM, Kobisch M. Seroepidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs from farrow-to-finish farms. *Vet. Microbiol.* 2001; 78: 331-341.

Le Potier M, Kobisch M, Abiven P, Crevat D and Desmettre P. Blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs. IOM Letters, Vol 2, 9th Int. Congr., Iowa State. University. Ames, Iowa, United States. 1992: 207.

Lluch MS. Estudio de la Expresión Génica y División Celular en *Mycoplasma genitalium* (tesis doctoral). Barcelona, España: Universidad Autónoma de Barcelona. 2010 (citado enero 2013) Disponible en: URL: http://ddd.uab.cat/pub/tesis/2011/hdl_10803_3635/mls1de1.txt

Lorenzo H, Quesada O, Assuncao P, Castro A, Rodríguez F. Cytokine expression in porcine lungs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 2006; 109: 199-207.

Luciano M, Porcaro J y Giordano A. Estrategia de prevención en una granja de producción intensiva de cerdos positiva a *Mycoplasma hyopneumoniae* (tesina de Licenciatura) Facultad de Ciencias Veterinarias UNCPBA. 2009 (citado enero 2013) Disponible en: URL: http://biblio.unicen.edu.ar/?p=get_document&id=56795-1.

Marois C, Le Carrou J, Kobisch M, Gautier-Bouchardon A. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets. *Vet. Microbiol.* 2007; 120; 96-104.

Mendoza E y Ciprian C. Aplicación de la serología para el diagnóstico y control de las enfermedades del "Complejo Respiratorio Porcino". Artículo Técnico. *Porcicultura.* 2004 (citado enero 2013) Disponible en: URL: <http://www.engormix.com/MA-porcicultura/sanidad/articulos/aplicacion-serologia-diagnostico-control-t186/165-p0.htm>

Miranda E, Sánchez E, Náquira C, Somocursio J, Ayala E, Miranda G. Evaluación de una prueba de aglutinación de látex para el diagnóstico serológico de la equinococosis quística. *Rev Perú Med Exp Salud Pública*. 2009; 26(2): 198-202.

Morris C, Gardner I, Hietala S, Carpenter T, Anderson R, Parker K, Seroepidemiologic study of natural transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in a swine herd. *Prev. Vet. Med.* 1995; 21: 323-337.

Morton HE. *Mycoplasma*-latex agglutination reaction. *J. of bacteriol.* 1966; 92 (4): 1196-1205.

Nicolet J, Paroz P, Bruggmann S. Tween 20 soluble proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* as antigen for an enzyme linked immunosorbent assay. *Res Vet Sci*. 1980; 29(3): 9-305.

Okada M, Testuo A, Satoshi F, Munenori O, Tetsuo A, Satoshi F, Yasuyuki M, et al. Serological diagnosis of enzootic pneumonia of swine by a double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody and recombinant antigen (P46) of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Microbiol.* 2005; 105: 251-259.

Organización Internacional de Epizootias, Organización Mundial de Sanidad Animal. Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los Animales Terrestres 2013. 2013 (citado mayo 2014) Disponible en: URL: <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-terrestre/acceso-en-linea/>

Pieters M, Pijoan C, Fano E, Dee S. An assessment of the duration of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in an experimentally infected population of pigs. *Vet. Microbiol.* 2009; 134: 261–266.

Pijoan C. Actualidades en el control de las enfermedades respiratorias. Memorias del V Congreso Centroamericano y del Caribe de Porcicultura. San José de Costa Rica. 2001: 20-21.

Pijoan C. Neumonía enzoótica de los Cerdos. Departamento de bacteriología del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias. SAG. México, D.F. 2002 (citado octubre) Disponible en: URL: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol1/CV1v1c03.pdf>

Rai G, Zachariah K, Sharma R, Phadke S, Belapurkar K. Pneumococcal antigen detection in cerebrospinal fluid: a comparative study on counter immunoelectrophoresis, latex agglutination and coagglutination. *Compar. Immunol., Microbiol. & Infec. Diseases*. 2003; 26: 261-267.

Ramos G. Fragmentación del ADN espermático de hombres infértiles con infección genitourinaria ocasionada por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma sp.* Efecto de la terapia antibiótica y antioxidante (Tesis doctoral) Madrid, España: Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias. 2011 (citado 5 enero 2013) Disponible en: URL: http://digitool-uam.greendata.es//exlibris/dtl/d3_1/apache_media/L2V4bGlicmlzL2R0bC9kM18xL2FwYWNoZV9tZWRpYS80NDA1MA==.pdf

Roberts D y Pijoan C Identification of *Mycoplasma hyorhinis*. *Br. Vet J.* 1977; 127: 582-587.

Ross RF. Chronic pneumonia of swine with emphasis on *Mycoplasma pneumonia*. Proceedings AASV. 30th. Annual Meeting February 28-March 2, 1984. St. Louis, Missouri: Proceedings of de American Association of Swine Practitioners, 1984.

Ross RF. Mycoplasmal diseases: Straw BD, Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ. Editors. Diseases of swine 8th ed. Ames, Iowa, USA: Iowa State University Press. 1999: 495-509.

Rottem S. Interaction of *Mycoplasmas* with host cells. *Physiol.* 2003; 83:417-32.

Salceda RJ. Epidemiología de la neumonía enzoótica porcina en purépero, Michoacán (tesis de Licenciatura) Morelia (Michoacán) México: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2010 (citado enero 2013) Disponible en: URL: <http://www.vetzoo.umich.mx/phocadownload/Tesis/2011/Marzo/epidemiologa%20de%20la%20neumona%20enzotica%20porcina%20en%20purperero%20michoacn.pdf>

Sarradell L. Caracterización histológica, inmunohistológica y ultraestructural de las lesiones pulmonares producidas natural y experimentalmente por *Mycoplasmas* en ganado caprino y porcino (tesis doctoral) Gran Canaria: Universidad de las palmas de gran canaria. Departamento de morfología. 2001 (citado enero 2013) Disponible en: URL: <http://acceda.ulpgc.es/bitstream/10553/2252/1/863.pdf>

Sibila M, Nofrarías M, López-Soria S, Segalés J, Valero O, Espinal A, Calsamiglia M. Chronological study of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection, seroconversion and associated lung lesions in vaccinated and non-vaccinated pigs. *Vet. Microbiol.* 2007; 122: 97-107.

Sibila M, Pieters M, Molitor T, Maes D, Haesebrouck F, Segales T. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *The vet. J.* 2009; 181: 221-231.

Slavik M y Switzer W. Adaptation of a latex agglutination tube test for diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae* swine pneumonia. *Vet. Microbiol.* 1979; 4: 157-168.

Sorensen V, Ahrens P, Barfod K, Feenstra A, Feld N, Friis N, Bille-Hansen V, *et al.* *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. *Vet. Microbiol.* 1997; 54: 23-34.

Stark KDC, Nicolet J, Frey J. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by air sampling with a nested PCR assay. *App. Env. Microbiol.* 1998; 64, 543±548.

Stock SRP. Curso de Métodos Físicoquímicos en Biotecnología. Cuernavaca, Morelos: Universidad Nacional Autónoma de México. 2007 (citado enero 2013) Disponible en: URL: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/inmunoquimica.pdf>

Strasser M, Apiven P, Kobisch M, Nicolet J. Immunological and pathological reactions in piglets experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* and/or *Mycoplasma flocculare*. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 1992; 31: 141-153.

Subramaniam S, Freyb J, Huang B, Djordjevic S, Kwanga J. Immunoblot assays using recombinant antigens for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* antibodies. *Vet. Microbiol.* 2000; 75: 99-106.

Takatori I. Etiology and serological diagnostic of swine enzootic pneumonia. *Japan Agricult. Reserch Quart.* 1970; 5(1): 39-45.

Thacker B, Thacker E, Halbur P, Minion F, Young T, Erickson B, Thanawongwech R. The influence of maternally derived antibodies on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. Proc 16th Int Pig Vet Soc Cong. Melbourn, Australia. 2000: 454.

Thanawongnuwech R y Thacker E. Interleukin-10, Interleukin-12 and interferon-gamma levels in the respiratory tract following *Mycoplasma hyopneumoniae* and PRRSV infection in pigs. *Viral Immunol.* 2003; 16: 357-367.

Torremorell M, Pijoan C, Ruiz A, Mendoza S. Transmisión de *Mycoplasma hyopneumoniae* en una granja con separaciones abiertas o sólidas determinada por la prueba de reacción en cadena de la polimerasa. *Vet. Mex.* 2006; 37 (2): 181-190.

Van Til L, Dohoo I, Morley R. Epidemiological associations between *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* antibody titers and lung lesions in Prince Edward Island swine herds. *Can. J. Vet. Res.* 1991; 55: 347-35.

Verdin E, Saillard C, Labbé A, Bové J, Kobisch M. A nested PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tracheobronchiolar washings from pigs. *Vet. Microbiol.* 2000; 76: 31-40.

Vicca J, Stakenborg T, Maesa D, Butaye P, Peeters J, De Kruif A, Haesebrouck F. Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Vet. Microbiol.* 2003; 97: 177–190.

Waites K, Katz B, Schelonka R. *Mycoplasmas* and *Ureaplasmas* as neonatal pathogens. *Clin. Microbiol.* 2005; 18(4):757-89.

Whitford H, Rosenbush R, Lauerman L. Mycoplasmosis in animals: Laboratory diagnosis. Ames, Iowa, United States: American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians. Iowa state University. 1994: 15-27.

Wu Y, Qui H, Zeng Y, You X, Deng Z, Yu M, Zhu C. *Mycoplasma genitalium* lipoproteins induce human monocytic cell expression of proinflammatory cytokines and apoptosis by activating nuclear factor κ B. *Mediat. Inflama.* 2008; 1:195-227.

Zaldívar M. El sistema inmunológico de las mucosas. *Rev. Cubana. Med. Gen. Integr.* 2002 (citado noviembre 2013) Disponible en: URL: http://bvs.sld.cu/revistas/mgi/vol18_5_02/mgi1252002.htm

Zhang Q, Young T, Ross R. Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. *Infect. and immun.* 1995; 63 (3): 1013–1019.

Zhi-Xin F, Guo-Qing S, Mao-Jun L, Hai-Yan W, Yuan G, Xu-Su W. Development and validation of a SIgA-ELISA for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Vet. Microbiol.* 2010; 143: 410-416.