



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO
DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



Aislamiento de *Mycoplasma spp* en cerdos con problemas respiratorios

Tesis

Para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

LUIS ENRIQUE LÓPEZ CERINO

DIRECTOR

DR. CARLOS LUNA PALOMERA

CO-DIRECTOR

DRA. ROSA ELENA MIRANDA MORALES

Villahermosa, Tabasco, México. Mayo del 2017

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco



UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

"EN DUDA EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



DIVISIÓN ACADÉMICA DE
CIENCIAS AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE ESTUDIOS TERMINALES

Asunto: Autorización de Impresión de
Trabajo Recepcional bajo la
Modalidad de: Tesis.

Fecha: 24 de febrero de 2017

LIC. MARIBEL VALENCIA THOMPSON,
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE CERTIFICACIÓN Y
TITULACIÓN DE LA UJAT.
P R E S E N T E.

Por este conducto y de acuerdo a la solicitud correspondiente por parte del interesado(a), informo a usted, con base al artículo 86 del Reglamento de Titulación Vigente en esta Universidad, la Dirección a mi cargo **autoriza** al (a) **C. Luis Enrique López Cerino**, con **matrícula 102C13134**, egresado(a) de la licenciatura de **Medicina Veterinaria y Zootecnia**, de la División Académica de Ciencias Agropecuarias, **la impresión de su trabajo recepcional** bajo la modalidad de **Tesis**, Titulado: **"Tipificación de micoplasmas aislados de cerdos con problemas respiratorios en México"**

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

DR. ROBERTO FLORES BELLO
DIRECTOR

U.J.A.T.



DIVISIÓN ACADÉMICA DE
CIENCIAS AGROPECUARIAS
RECEPCION

C.c.p.- Expediente Alumno.
Archivo
DR.RFB/MC.AMA

Miembro CUMEX desde 2008
Consortio de
Universidades
Mexicanas
UNA ALIANZA DE CALIDAD POR LA EDUCACIÓN SUPERIOR

Km 25 de la carr. fed. 195, tramo Villahermosa-Tehuacan
Ra. La Huasteca, 2ª sección, 86298, Centro, Tabasco, México
Tel. (+52 993) 3581500-Ext. 6644
Correo electrónico: terminalesdaca@gmail.com

Carta de autorización

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente la Tesis de grado denominada "**Aislamiento de *Mycoplasma spp* en cerdos con problemas respiratorios en México**" de la cual soy autor y titular de los derechos de autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de la Tesis antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa mas no limitada para subirla a la red de bibliotecas digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con la que la Universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la Tesis mencionada y para los fines estipulados en este documento.

Se firma la presente autorización en la Ciudad de México, a los 24 días del mes de Abril del año 2017.

AUTORIZO


Luis Enrique López Cerino

AGRADECIMIENTOS

A mi institución:

A la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco y especialmente a la División Académica de Ciencias Agropecuarias por darme las herramientas para formarme como Médico Veterinario y Zootecnista.

A mis maestros:

Los cuales compartieron sus conocimientos y experiencias conmigo. Aprendí de sus clases y pude contar con ellos cuando lo necesité.

A mi Co-Directora de tesis:

Agradezco a la Dra. Rosa Elena Miranda Morales por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo en su laboratorio de Micoplasma, por brindarme sus conocimientos en Micoplasma, por su dedicación, paciencia y por confiar en mí para la realización de este proyecto.

A mi Directo de Tesis:

Dr. Carlos Luna Palomera por confiar en mí, por apoyarme en este proyecto y compartir sus conocimientos conmigo.

Agradezco a la M. en C. Verónica Rojas Trejo por el apoyo y conocimientos compartidos para este proyecto. A mis compañeros de trabajo por haberme apoyado en el proyecto.

Agradezco a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, en especial al Laboratorio de Micoplasma del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradecimiento a la Dirección general del personal académico DGAPA por apoyar el proyecto IN-222515 "Caracterización de la diversidad genética de *Mycoplasma hyopneumoniae* de cerdos con problemas respiratorios". Para la realización de esta tesis.

DEDICATORIA

A mis padres que en todo momento de mi carrera me apoyaron y acompañaron en este largo camino, que han estado allí desde los comienzos de mi vida escolar, que me han alentado a seguir adelante y por los valores que me enseñaron durante toda mi vida.

A mis hermanos con los que he compartido momentos maravillosos.

Para las personas que han estado allí para darme alguna motivación o palabras de aliento y superación.

A mi novia Lesly Vargas Rojano que me ha acompañado en este difícil camino que con su apoyo y compañía he superado. Por confiar en mí y por enseñarme en esta etapa de la vida a ver las cosas con optimismo, a superarme diario y por estar conmigo.

ÍNDICE

LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMEN	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	10
Objetivo general.....	11
Objetivo específico.....	11
Hipótesis.....	11
Justificación.....	11
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	12
2.1. Micoplasmas.....	13
Genoma.....	13
2.2. Neumonía enzoótica.....	15
2.3. Características generales de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	15
Epidemiología.....	16
Transmisión.....	16
Horizontal.....	16
Patogénesis.....	17
Signos clínicos.....	17
Lesiones.....	19
2.4. Diagnóstico de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	20
2.5. Identificación serológica.....	21
Inhibición del crecimiento.....	21
Inhibición del metabolismo.....	22
2.6. Detección serológica de la infección por <i>M. hyopneumoniae</i>	23
2.7. Control.....	24
3.0 MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
3.1. Ubicación geográfica.....	26

3.2. Muestras.....	26
3.3. Muestreo	26
3.4. Aislamiento de Micoplasmas	26
3.5. Purificación de la cepa	27
3.6. Identificación del género <i>Mycoplasma spp.</i>	28
4.0 RESULTADOS.....	31
4.1. Aislamiento de colonias con morfología típica a Micoplasmas.....	31
5.0 DISCUSIÓN	34
5.1. Aislamiento de <i>Mycoplasma spp.</i>	34
6.0 CONCLUSIONES.....	37
7.0 ABREVIATURAS.....	38
8.0 REFERENCIAS.....	39

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

LISTA DE CUADROS**PAG**

Cuadro 1	Problemas de salud comúnmente identificados a nivel mundial	12
Cuadro 2	Medio de cultivo líquido de Friis.	29
Cuadro 3	Procesamiento de las muestras	30
Cuadro 4	Aislamiento de colonias con morfología de micoplasma de hisopos nasales de cerdos con problemas respiratorios	32
Cuadro 5	Aislamiento de colonias con morfología de micoplasma de pulmones de cerdos con lesiones respiratorias	33
Cuadro 6	Resultados de las pruebas básicas de identificación para el género <i>Mycoplasma spp.</i>	34

LISTA DE FIGURAS**PAG**

Figura 1	Colonias de <i>Mycoplasma spp</i> sin punto central aisladas de hisopos nasal y pulmón de cerdo con problemas respiratorios vistas con Microscopio estereoscópico con aumento de 2x	32
Figura 2	El halo de inhibición con la prueba de la Digitonina, muestra la dependencia de esteroides por el aislado	33

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue aislar a los Micoplasmas asociados a la enfermedad de Neumonía Enzoótica Porcina. Se procesaron 74 muestras, 55 muestras de hisopos nasales de cerdos con problemas respiratorios, con un rango de edad de 4 a 12 semanas de unidades de producción del Estado de Guanajuato y del Estado de Hidalgo, y 19 muestras de pulmones con lesiones características de la enfermedad, obtenidos de un rastro del municipio de Xalapa, Veracruz. Las muestras fueron procesadas en el medio de Friis, mediante la técnica de aislamiento como lo indica (Tully., 1983) en líquido y sólido, incubadas a 37 °C en aerobiosis y microerobiosis para permitir el desarrollo de bacterias similares a Micoplasmas. De las 74 muestras 38 (51.35%) fueron positivas a la presencia de colonias típicas de micoplasmas y 36 (48.64%) fueron negativas. Se observó que del total de las muestras positivas 29 (52.7%) y 9 (47.3%) fueron de hisopos nasales y pulmón respectivamente. Los aislados se identificaron como *Mycoplasma* spp con las pruebas de filtrabilidad por 0.45 micras, morfología colonial, dependencia a esteroides con la prueba de la digitonina. Observando una prevalencia de 51.35% de *Mycoplasma* spp en las muestras de hisopos nasales y pulmones de cerdos con problemas respiratorios.

Palabras claves. *Mycoplasma* spp, Neumonía Enzoótica Porcina, Aislamiento bacteriano.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades respiratorias se encuentran entre los problemas más importantes de salud asociados con la producción porcina. Los procesos respiratorios en cerdos raramente están causados por un solo microorganismo, habitualmente se deben a la interacción de diferentes patógenos, primarios y secundarios como Virus del Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino, Virus de la Gripe Porcina, Circovirus Porcino tipo 2, Virus de la Enfermedad de Aujeszky, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis* y *Actinobacillus pleuropneumoniae* que en conjunto y sumado a los factores ambientales y a las prácticas de manejo de las explotaciones, desencadenan las enfermedades (Martínez Lobo et al., 2007).

La Neumonía Enzoótica Porcina (NEP) causada principalmente por *M. hyopneumoniae* (Hansen et al., 2010), enfermedad de alta distribución mundial, afectando en mayor medida a los sistemas de producción intensivos.

Mycoplasma hyopneumoniae es el agente directo responsable de la Neumonía Enzoótica Porcina (enfermedad crónica que afecta a los cerdos). Esta enfermedad es altamente prevalente, (entre 30% y 100%) en la producción porcina del mundo, *Mycoplasma hyopneumoniae* causa infecciones que provocan pérdidas económicas significativas (Thacker y Minion, 2010).

Se ha demostrado que *Mycoplasma hyorhinis* y *M. flocculare* también juegan un papel importante tanto en la (NEP) como en el complejo respiratorio porcino (CRP) (Lin et al., 2006; Palzer et al., 2008; Hansen et al., 2010).

Objetivo general

Detectar la presencia de micoplasmas asociados a la Neumonía Enzoótica Porcina, por medio del aislamiento e identificación del género con el fin de establecer la prevalencia del microorganismo en cerdos con problemas respiratorios.

Objetivo específico

Aislar bacterias del género *Mycoplasma* spp en el medio de Friis a partir de muestras de hisopos nasales y pulmones de cerdos con problemas respiratorios.

Identificar con pruebas básicas, digitonina, filtrabilidad y morfología colonial, las bacterias del género *Mycoplasma* spp

Hipótesis

Los micoplasmas *son bacterias* asociadas a problemas respiratorios de los cerdos, es factible aislar al agente responsable de la Neumonía Enzoótica porcina en un 20% de las muestras analizadas, si los cerdos presentan problemas respiratorios crónicos de esta manera es probable evidenciar a *Mycoplasma hyopneumoniae* en las unidades de producción.

Justificación

Debido a que la Neumonía Enzoótica porcina es una enfermedad respiratoria crónica de alta morbilidad, es importante aislar a los micoplasmas involucrados como patógeno primario a partir de muestras de hisopos nasales y pulmones de cerdos con problemas respiratorios con el fin de identificar al género y especie por medio de pruebas de diagnóstico bacterianas.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

Los problemas de neumonías en cerdos se deben a una interacción entre patógenos, primarios y secundarios (Cuadro 1), sumado a los factores ambientales y a las prácticas de manejo de las explotaciones, desencadenan las enfermedades (Martínez Lobo et al., 2007). Dentro de los cuales se destacan los Micoplasmas.

Cuadro 1. Problemas de salud comúnmente identificados a nivel mundial	
Problemas de salud:	Proporción de responsables
PRRS	50.1%
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	41.7%
<i>Escherichia coli</i>	35.6%
<i>Streptococcus suis</i>	34.8%
Swine Influenza	34.8%
Ileitis	34.4%
<i>Haemophilus parasuis</i>	28.6%
PCV2AD	25.4%
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	21.3%
Disenteria Porcina	17.5%
Lombris/Parasitos	17.1%
Úlcera gástrica	16.1%
<i>Pasteurella multocida</i>	11.5%

Rostagno et al.; IPVS 2014

2.1. Micoplasmas

Los micoplasmas son taxonómicamente clasificados como miembros de la clase de los Mollicutes, un grupo de bacterias caracterizadas por la falta de una pared celular. Las células de Micoplasmas son en su mayoría esféricas y su tamaño es de un intervalo de 0.3 a 0.8 micras (Razin, 2006).

Pudiendo atravesar filtros de entre 220 y 450 nm. Poseen una membrana plasmática trilaminar de 7.5-10 nm de grosor (a diferencia de las demás membranas bacterianas, contiene colesterol, fosfolípidos y glicoproteínas) que junto con las proteínas constituyen los determinantes antigénicos más importantes (Poveda et al., 2002). La capa más externa está compuesta por proteínas (la cual da al *Mycoplasma* la capacidad de adherirse a las células respiratorias mediante interacciones hidrofóbicas) y por carbohidratos; además se observa una especie de cápsula de naturaleza polisacárido. Su citoplasma es rico en ribosomas, gránulos citoplasmáticos y su núcleo está constituido por moléculas bicatenarias de ADN y ARN (Andrada et al., 2002).

Genoma

El genoma de los micoplasmas es de alrededor de 600 a 2,000 kb, correspondiente a 600-800 genes, que es el mínimo necesario para tener vida independiente. Este presenta un bajo contenido de guanina y citosina, entre 23-40% y es rico en adenina y timina, hasta un 70%. Además, utilizan un código genético alternativo, donde el codón TGA codifica el aminoácido triptófano en lugar de la habitual señal de paro de las procariontas (Nicholas et al., 2008, Dybving et al., 1996).

Este bajo número de genes corresponde con la cantidad de proteínas que pueden sintetizar (en torno a 400) y, en consecuencia, también está relacionado con su capacidad metabólica y actividad enzimática. De ahí viene su modo de vida como parásito (Razin y Freundt, 1984). Las cepas de *Mycoplasma hyopneumoniae* secuenciadas hasta el momento son las cepas J 232 y 7448, aisladas en México y Estados Unidos (Minion et al., 2004; Vasconcelos et al., 2005; Liu et al., 2011).

Cottew et al., 1987 demostraron que algunas especies de micoplasmas están filogenéticamente altamente relacionadas, siendo clasificadas dentro del mismo

grupo "mycoides" esta relación está clara con las pruebas bioquímicas convencionales, reacciones inmunológicas, hibridación del ADN, análisis de la secuencia de ARNr 16S por medio de la técnica de PCR (*Thiaucourt et al., 2000; Nicholas 2002*), es así que la identificación de estas especies se dificulta ya que no pueden ser diferenciados bioquímicamente, además de presentar reacción cruzada con antisueros policlonales dirigidos contra los diferentes miembros del grupo (*Taylor et al., 1992*).

Los ribosomas de estos microorganismos presentan las características típicas de las procariotas, con un coeficiente de sedimentación 70S, con tres tipos de ARN ribosomal, (5S, 16S y 23S), en estas estructuras especialmente en la 16S ARNr existe un alto grado de conservación en las secuencias nucleotídicas en la Clase *Mollicutes*, por ello se utiliza como marcador filogenético para la diferenciación de los géneros *Mycoplasma* y *Acholeplasma*, aunque presenta la desventaja de contar con un gran número de copias en su genoma, lo que puede provocar o conllevar a la identificación de secuencias o marcas moleculares múltiples en un solo organismo (*Razin, 1984*).

Debido a que su genoma es pequeño, los micoplasmas se someten a un metabolismo limitado y tienen pocas rutas biosintéticas (*Razin et al., 1998*). La falta de vías biosintéticas implica que necesitan purinas y pirimidinas para obtener aminoácidos y componentes de la membrana para su crecimiento en el ambiente (*Thacker and Minion, 2010*).

A pesar de las diferencias fundamentales entre micoplasmas y otras bacterias, muchos aspectos de la biología molecular de los micoplasmas son similares a las bacterias gram-positivas (*Thacker and Minion, 2010*).

2.2. Neumonía enzoótica

La Neumonía Enzoótica Porcina, también conocida como neumonía micoplasmal, es causada por *M. hyopneumoniae* (*Mh*), es una de las enfermedades más importantes que asociadas con otros microorganismos, causa pérdidas en la producción porcina (*Sibila et al., 2009; Simionatto et al., 2013*). La infección es caracterizada por una tos esporádica, seca y no productiva, retraso en la tasa del crecimiento y la utilización ineficiente del alimento. Esta enfermedad no tiene una alta mortalidad, pero sí una alta morbilidad. Esta infección ocurre generalmente por contacto directo con secreciones respiratorias de animales portadores. Sin embargo, se han encontrado informes que hablan de una transmisión en el aire incluso a varios kilómetros de distancia (*Stark et al., 1998; Otake et al., 2010*).

2.3. Características generales de *Mycoplasma hyopneumoniae*

Las colonias de (*Mh*), se caracterizan por poseer forma cocoide, no presentan motilidad y producen pequeñas colonias carentes de punto central, normalmente convexas y granulares al ser observadas con magnificación. Presentan un crecimiento lento al ser cultivadas *in vitro*, pudiendo ser utilizados para este fin diferentes medios de cultivos, entre los que se encuentran; Friis, SP4 y medio A26. Las condiciones óptimas de cultivo, se encuentran a 37 °C con agitación constante (*Brown, 2010*). Desde el punto de vista bioquímico (*Mh*) se caracteriza por fermentar la glucosa mientras no es capaz de hidrolizar la urea o la arginina (*Friis, 1972; Ross y Wittlestone, 1983*).

Epidemiología

La Neumonía Enzoótica Porcina presenta una distribución mundial, con mayor prevalencia en aquellos países donde existe un alto índice de producción porcina (Thacker, 2006). Los cerdos domésticos y jabalíes se pueden ver afectados por (*Mh*), (Sibila et al., 2010) (Sibila et al., 2004a; Fano et al., 2007; Maes et al., 2008a; Martínez et al., 2009; Fraile et al., 2010; Meyns et al., 2011; Fablet et al., 2012b; Nathues et al., 2012b).

Además, la prevalencia es mayor en los lechones destetados, de 0 a 51 por ciento (Sibila et al., 2004a; Fano et al., 2007; Sibila et al., 2007b).

Transmisión

La transmisión de *Mh* puede tener lugar por diferentes rutas. La transmisión entre los rebaños se produce principalmente por la introducción de animales infectados o aerotransportado. En cuanto a la transmisión dentro de los rebaños, se puede distinguir entre verticales (de la cerda a la descendencia) y la transmisión horizontal (entre los cerdos del mismo corral). La transmisión horizontal se produce predominantemente a través del contacto nariz con nariz (Calsamiglia y Pijoan, 2000). Hasta la fecha, no se ha informado transmisión en el útero o lactogénica.

Horizontal

El contacto de nariz a nariz entre compañeras del corral o incluso entre los cerdos de diferentes corrales puede dar lugar a la propagación de (*Mh*), de animales infectados susceptibles (Thacker y Minion, 2012).

La transmisión aérea ha demostrado ser importante para (*Mh*). Ya que (Goodwin, 1985) declaró que los rebaños libres de (*Mh*), pueden infectarse con este patógeno si otros rebaños infectados se encuentran dentro de una distancia de 3,2 kilómetros.

M. hyopneumoniae coloniza las células epiteliales ciliadas del tracto respiratorio, dañando las células y predispone a animales infectados de invasores secundarios (Thacker and Minion, 2010).

Pese a que todos los animales son susceptibles, los animales en crecimiento son los que se ven en su mayoría más afectados. En rebaños sin inmunidad puede afectar a cerdos de todas las edades, incluyendo lechones y animales de cría (Sibila et al., 2007).

Patogénesis

La patogénesis de las infecciones por (*Mh*), incluye varios pasos: adherencia a las vías respiratorias, la modulación del sistema inmune que conduce a daños de tejido pulmonar y la persistencia en el tracto respiratorio, así como la interacción con otros agentes infecciosos. Tos no productiva es el signo clínico más obvio. Las lesiones macroscópicas son caracterizadas por bronconeumonía catarral. Consisten en rojo a púrpúreo, áreas consolidadas en los lóbulos pulmonares como en las partes, craneal ventral, apical, cardíaca, accesorios y lóbulos diafragmáticos. El diagnóstico de la neumonía enzoótica se hace generalmente a nivel de rebaño en lugar de a nivel individual nivel (Thacker y Minion, 2012; Taylor, 2013).

Signos clínicos

La presencia de la tos en cerdos de engorde combinados con lesiones de bronconeumonía crónica, así como el pobre rendimiento y la eficiencia de la alimentación durante el período de engorde pueden llevar a un presunto diagnóstico de la neumonía enzoótica. Sin embargo, el diagnóstico definitivo se basa en la detección de (partes de) *Mh*. El diagnóstico diferencial debe considerar otras posibles causas de tos, así como las bacterias y los virus que causan lesiones de neumonía similares a *Mycoplasmas* (Sibila et al., 2009).

La forma clínica puede afectar parámetros productivos tales como el índice de conversión alimenticia o la ganancia media diaria de peso (*Straw et al., 1999; Sibila et al., 2009*). A nivel pulmonar, la infección por este patógeno suele dar lugar a una neumonía bronquiolo-intersticial que en asociación con otras bacterias pasa rápidamente a bronconeumonía catarral-purulenta. La visión macroscópica habitual de estas lesiones es de consolidación pulmonar cráneo ventral.

A nivel de campo, se han observado dinámicas de infección variables que pueden afectar la gravedad y la frecuencia de las lesiones pulmonares (*Vicca et al., 2003*). Esta variabilidad se ha atribuido a factores tales como la presencia de coinfecciones, condiciones de manejo y estabulación y, finalmente, a la existencia de distintas cepas de *M. hyopneumoniae* que podrían tener distinta virulencia (*Vicca et al., 2003; Maes et al., 2008*). El conocimiento que se tiene hoy en día de este último factor es bastante limitado.

A nivel individual: un mismo animal puede estar coinfectado simultáneamente por varias cepas de *Mh*, (*Nathues et al., 2011; Vranckx et al., 2011; Charlebois et al., 2014*). Además, se ha sugerido que esta infección por distintas cepas podría dar lugar a lesiones pulmonares más graves (*Villareal et al., 2011; Vranckx et al., 2011*). También se ha descrito que la infección con *Mh*, no impide la colonización posterior con una variante clonal de la cepa o con otra cepa de baja virulencia (*Vranckx et al., 2011; Villareal et al., 2011*).

A nivel de granja: se sabe que puede haber más de una cepa en circulación pero que, en general, el brote de neumonía enzoótica está producido por solo una cepa (*Nathues et al., 2011*). Dentro de los factores de riesgo que podrían contribuir a la introducción de nuevas variantes de *M. hyopneumoniae* en una granja serían los sistemas de producción tradicionales (flujo continuo) y la proximidad a otras granjas (*Nathues et al., 2011, Charlebois et al., 2014*).

A nivel territorial: se han descrito diferencias en cuanto a la variedad de cepas circulantes entre países, zonas geográficas e incluso entre granjas de un mismo país. Por el momento no se ha detectado ninguna relación entre cepa y origen

geográfico (*Dos Santos et al., 2015*). Entender la variabilidad entre cepas de *Mh*, es importante para conocer mejor la epidemiología de la infección e intentar obtener un mayor rendimiento de las herramientas de control establecidas.

Lesiones

Las lesiones pulmonares de *Mh*, constan de un color púrpura a gris en áreas de consolidación pulmonar, principalmente localizada bilateralmente en los lóbulos apical, intermedio, accesorio y las piezas craneales del lóbulo diafragmático (*Maes et al., 2008*).

Tales lesiones se denominan como consolidación pulmonar craneoventral (CPCV). Los lóbulos inflamados se producen a principios y mediados de las etapas de la infección, mientras que las lesiones crónicas consisten generalmente de cicatrices interlobulares con retracción del tejido (*Maes et al., 2008*).

En tal escenario, la presencia de CPCV puede ser indicativo de la participación de (*Mh*). Sin embargo, ya que otros microorganismos pueden producir lesiones similares, es necesario realizar pruebas de laboratorio para la confirmación (*Thacker, 2004; Sibila et al, 2009*).

A nivel de matadero, la evaluación de las lesiones pulmonares se utiliza comúnmente para estimar la prevalencia y gravedad de las enfermedades respiratorias y su impacto en el precio de la canal en el mercado y la evaluación de factores de riesgo, la eficacia de la vacuna (*Sibila et al, 2009; Meriardi et al, 2012*).

2.4. Diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae*

Varias metodologías se utilizan para diagnosticar las infecciones causadas por (*Mh*). Los signos clínicos y lesiones patológicas se utilizan para un diagnóstico presuntivo de Neumonía Enzoótica, pero se requieren pruebas de laboratorio para un diagnóstico efectivo. Aunque el cultivo de (*Mh*) es considerado la prueba de oro para el diagnóstico, este método no es utilizado habitualmente (*Sibila et al., 2009*). Esto se debe a que el aislamiento del patógeno en medio Friis es muy complicado (*Friis, 1975*). Además, la presencia de otra especie de micoplasma puede inhibir el crecimiento de (*Mh*), representando su aislamiento aún más difícil. Por lo tanto, el hecho de cultivar este organismo de animales potencialmente infectados, no se puede descartar la infección en la manada (*Thacker, 2004*). Actualmente la prueba de PCR es la técnica más sensible para detectar infecciones causadas por (*Mh*) (*Calsamiglia et al., 1999*).

El primer aislamiento de *M. hyopneumoniae* se realizó en 1965 en los EE.UU. (*Mare y Switzer, 1965*) y el Reino Unido (*Goodwin et al., 1965*).

En los años 70's del siglo pasado, la investigación importante se llevó a cabo para determinar las principales características de este organismo. Es muy sensible a las condiciones ambientales debido a la ausencia de una pared celular (*Goodwin, 1972*). En 1973, la cepa J fue aislada (*Whittlestone, 1973*), que sigue siendo considerado como la cepa de referencia. Puede cultivarse *in vitro*, pero requiere medio suplementado con suero y crecimiento en el medio Friis (*Friis, 1975*). El cultivo y aislamiento de (*Mh*) es laborioso, consume tiempo y con frecuencia no es exitoso, por lo que el aislamiento no se utiliza para la rutina diagnóstica. Por otra parte, hay contaminación frecuente con otros micoplasmas tales como *M. hyorhinis* (presente en el tracto respiratorio de los cerdos) y *M. flocculare* (especie no patógena que tiene similitudes con respecto a morfología, crecimiento y antigenicidad de (*Mh*), (*Thacker y Minion, 2010*). La fastidiosa naturaleza de los micoplasmas y la falta de sistema genético para esclarecer las estructuras de las proteínas y funciones han dificultado la comprensión de su biología. Las especies de micoplasmas han desarrollado estrategias para variar su topografía en la

superficie para evitar la detección y erradicación por la respuesta inmune del huésped (*Browning et al., 2011*).

La identificación de este patógeno en el diagnóstico de laboratorio por infecciones por *Mycoplasma* se ha basado en los análisis bacteriológicos clásicos incluyendo la morfología, características de cultivos, fisiológicas y propiedades serológicas. Si bien estas pruebas siguen ocupando una parte importante en el diagnóstico de este agente, nuevas pruebas basadas en el análisis molecular de ADN genómico, ADN ribosomal, proteínas de la célula y los lípidos, parecen hacer a un lado a las pruebas clásicas y se puede esperar que estas pruebas moleculares prevalezcan en la identificación de Micoplasmas, en particular con respecto a las especies de crecimiento lento y/o extremadamente exigentes.

2.5. Identificación serológica

La tradicional identificación por métodos serológicos del agente etiológico está basada sobre la inhibición del crecimiento, inhibición del metabolismo, epifluorescencia y peroxidasa (*Lambert, 1987*) y un método más reciente es el dot-ELISA.

Inhibición del crecimiento

Está basada en la observación de la inhibición del crecimiento mediante un antisuero específico y se puede realizar sobre el medio de cultivo sólido y líquido. En el medio sólido se observan halos de inhibición y en el medio líquido se realiza la prueba inhibición del metabolismo. La inhibición del crecimiento en el medio sólido es una prueba específica y se requiere un medio de cultivo apropiado, un antisuero con altos títulos y un microscopio estereoscópico. Los micoplasmas en estudio deben estar en cultivo puro ya que los cultivos mezclados pueden ocasionar conclusiones erróneas porque la zona de inhibición puede estar enmascarada por el desarrollo del organismo no inhibido. El inóculo de micoplasmas deben tener 10^{-4} a 10^{-5} UFC /ml. Después de realizar la siembra es recomendable poner el medio

sólido a temperatura de 22-30°C antes de poner las placas a 37°C para evitar falsos negativos, debido a que los microorganismos que desarrollan rápidamente producen pequeñas zonas de inhibición. Cuando no se observan halos definidos de inhibición o se observan colonias dentro del halo de inhibición es recomendable repetir la prueba. Los halos de inhibición se deben medir a partir del borde del papel filtro hasta la línea de desarrollo de los micoplasmas. Un halo positivo debe medir 5mm o más y zonas menores se deben considerar negativas (Goll, 1994).

Inhibición del metabolismo

Es una prueba muy específica y de alta sensibilidad. Esta prueba es utilizada para clasificar y caracterizar micoplasmas, detectar diversidad antigénica entre especies, determinar títulos de anticuerpos o evaluar la potencia de un suero de prueba utilizando cultivos conocidos de micoplasmas y realizar estudios epidemiológicos. La técnica está basada en la multiplicación de los micoplasmas en el medio líquido conteniendo un sustrato específico (glucosa, arginina, urea o tetrazolio) que será utilizado por el metabolismo bacteriano. Los productos metabólicos alterarán el pH del medio de cultivo provocando cambios de color (UCC). El cultivo bacteriano debe estar titulado para lograr una apropiada dilución de 100-1000 unidades cambio de color (UCC) sobre una unidad de volumen. La técnica utiliza antisueros homólogos para inhibir micoplasmas, la actividad inhibitoria de los antisueros decrece el metabolismo bacteriano y, por lo tanto, indirectamente, previene el cambio de color. Un título de prueba de un suero es la más alta dilución de suero que previene un cambio de color del medio. Los sueros de animales tratados pueden inhibir la multiplicación de los micoplasmas y minimizar el efecto de los anticuerpos. La contaminación bacteriana puede provocar una interpretación errónea en un título bajo del antisuero (Goll, 1994).

2.6. Detección serológica de la infección por *M. hyopneumoniae*

Las pruebas serológicas se utilizan comúnmente para controlar el estado de salud de las piaras de cerdos. La detección de anticuerpos frente a (*Mh*) se puede lograr mediante la prueba de ELISA y con menor frecuencia mediante la prueba de fijación del complemento. Los perfiles de anticuerpos en rebaños de cerdos requieren una prueba simultánea de grupos de animales de diferentes edades (estudio transversal) o la prueba de un grupo de animales en todo el ciclo de producción por la prueba de ELISA.

La prueba de ELISA en este contexto es un método rápido, de bajo costo y fácilmente automatizado que proporciona información útil sobre la presencia de anticuerpos de orígenes maternos y adquiridos, así como en el tiempo necesario para que los animales sufran seroconversión. Un bloqueo por ELISA (IDEI, kit *Mycoplasma hyopneumoniae* EIA Oxoid) y dos pruebas de ELISA indirectas (HerdChek, IDEXX y Tween-20-ELISA) son las pruebas serológicas de uso más frecuentes. Pruebas que detectan anticuerpos contra (*Mh*).

Estudios comparativos han reportado diferentes especificidades y sensibilidades entre estos kits (*Pijoan, 1994; Ameri-Mahabadi et al., 2005; Erlandson, 2005*), cuando las discrepancias en los resultados de las pruebas serológicas se han identificado, un inmunoensayo con Western Blot (WBI) la focalización de diferentes antígenos de (*Mh*) se puede usar para la confirmación de esta prueba (*Ameri et al., 2006*). La utilidad de un perfil de anticuerpo puede ser obstaculizada por la variación en los resultados de la prueba de ELISA dependiendo de la prueba utilizada (*Ameri-Mahabadi et al., 2005; Erlandson, 2005*); la incapacidad de la serología para diferenciar la infección natural de la vacunación; falta de correlación entre las diferentes medidas de títulos de anticuerpos; variaciones en la detección de anticuerpos frente a diferentes cepas de (*Mh*), (*Strait et al., 2004*); una variabilidad significativa en el tiempo empleado por los animales de seroconversión.

El retraso en la seroconversión está asociado con la infección de este patógeno debido al hecho de que (*Mh*) se fija al epitelio respiratorio ciliado y no invade el tejido

pulmonar a la misma medida que otros patógenos. Esto puede resultar en presentación más lenta de mayor antígeno de micoplasma para el huésped.

Cabe destacar el hecho que no existe una correlación entre los títulos de anticuerpos y la protección contra la infección (*Maes et al., 1996*).

2.7. Control

En el control de *Mh* además de los programas de vacunación existen otros elementos a tener en cuenta que tienen una incidencia directa sobre la circulación del agente (*Estrada, 2003*), tal es el caso de:

- Sistema todo adentro todo afuera
- Presencia de contaminantes ambientales como el amonio y el CO₂
- La humedad en las instalaciones
- La ventilación y velocidad del aire
- Destete temprano medicado o segregado

Entre los antibióticos que han mostrado ser altamente eficiente se encuentran la Tiamulina, Lincomicina, Tylosina, Aivlosin, Quinolonas y las Tetraciclinas (*Vicca y cols., 2002b*). Por otra parte, los programas de vacunación contra *Mh* proporcionan un efecto importante en relación con la disminución de la lesión pulmonar, el cuadro clínico y reduciendo la infección por agentes secundarios.

El uso de antibióticos como método de control y profilaxis está altamente extendido en la producción porcina industrial. La pauta de medicación más utilizada incluye el uso de piensos medicados de una a tres semanas, empezando una semana antes del comienzo de la enfermedad (*Thacker et al., 2004*). Este sistema reduce notablemente el número de células de *Mh* presentes, pero no logra evitar por completo la invasión por parte de este agente bacteriano.

Actualmente, la mayoría de los países con sistemas de producción intensivos de porcino incluyen pautas de vacunación frente a *Mh*. Como indicador de este dato,

cabe destacar que la vacuna frente a *Mh* es una de las dos vacunas más vendidas en el mercado de la sanidad animal a nivel global (*Meeusen et al., 2007*).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

3.0 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación geográfica

La colección de muestras se realizó de granjas de producción porcina en los estados de Hidalgo, Guanajuato y Veracruz, en el mes de Septiembre y Octubre del 2015.

3.2. Muestras

Se colectaron 74 muestras, de las cuales 55 fueron hisopos nasales de cerdos con problemas respiratorios de dos unidades de producción porcina ubicadas en el Estado de Guanajuato e Hidalgo. Y 19 pulmones de cerdos que presentaban lesiones neumónicas de un rastro en el municipio de Xalapa, Veracruz.

3.3. Muestreo

Se colectaron muestras de hisopos nasales de cerdos con problemas respiratorios, los cuales fueron depositados en el medio de cultivo de Friis, transportados y conservados a 4 °C. Los pulmones fueron depositados en recipientes estériles, transportados y conservados en congelación.

3.4 Aislamiento de Micoplasmas

Para el aislamiento de micoplasmas se utilizó el medio de cultivo de Friis (Cuadro 2) modificado (Friis, 1972). Los hisopos fueron incubados a 37 °C por 24 horas para permitir el desarrollo del micoplasmas. Los pulmones fueron macerados en el medio de cultivo de Friis en condiciones estériles. Posteriormente, se tomaron 200 µl de medio líquido del hisopo y 200 µl del macerado de pulmón y fueron depositados en 1.8 ml de medio líquido de Friis y se realizaron diluciones decimales, (10^{-1} hasta 10^{-5}). Las diluciones fueron incubadas en aerobiosis a 37 °C de 24 a 48 horas. Al mismo tiempo, se sembró en el medio sólido de Friis el cultivo del hisopo conservado en el medio líquido y del macerado de pulmón, se tomaron de cada uno de ellos 30 µl, las placas de agar fueron incubadas de 48 horas hasta 7 días en microaerobiosis a 37° C con el 80-85 % de humedad.

Las diluciones se revisaron cada 24 horas hasta observar cambio de pH y/o turbidez, las diluciones que presentaron cualquiera de las dos reacciones, se

sembraron en placas de medio sólido de Friis y se incubaron en microaerobiosis a 37° C con el 80-85 % de humedad. Las diluciones que no mostraron cambio de pH y/o turbidez fueron subcultivadas a los 7 días en medio líquido de Friis, se repitió este procedimiento por cuatro ocasiones para permitir el desarrollo bacteriano. Se observaron las placas de medio sólido cada 24 horas durante 7 días con la ayuda de un microscopio estereoscópico (Carl Zeiss) para distinguir colonias con morfología típica de *Mycoplasma* (Tully *et al.*, 1983) (Cuadro 3).

3.5. Purificación de la cepa

A partir de una colonia típica de micoplasma se realizó la metodología de clonación triple que consistió en tomar una colonia de la placa de agar semisólido con una pipeta Pasteur que se depositó en medio líquido y fue incubado de 24 a 48 horas o hasta que se observara cambio de pH o turbidez. Posteriormente el cultivo bacteriano se resembró en medio de cultivo semisólido para poder observar la morfología de las colonias bacterianas de micoplasmas. Este proceso se llevó a cabo por tres ocasiones para purificar el aislado y comprobar la morfología típica y lograr un cultivo puro, ya que se observó en el primocultivo el desarrollo de dos a tres colonias diferentes en una muestra (Howard., *et al* 1994).

3.6. Identificación del género *Mycoplasma spp*

Para la identificación del género se realizaron las pruebas de, morfología colonial, filtración por membrana de 0.45 micras, no reversión de formas "L" y sensibilidad a la digitonina, así las cepas fueron consideradas como *Mycoplasma spp* (Howard et al., 1994).

-Filtrabilidad 0.45 micras: Para desarrollar la prueba se hicieron pasar 2 ml de medio de cultivo por una membrana con poro de 0.45 μm . Posteriormente se depositó el inóculo en medio semisólido para confirmar que las bacterias son filtrables (Tully 1983).

-Sensibilidad a la Digitonina: La prueba fue realizada para diferenciar a los géneros *Acholeplasma* y *Mycoplasma* pertenecientes a la clase *Mollicutes*, debido a que morfológicamente sus colonias son iguales, con esta prueba se demuestra la dependencia de los esteroides por los micoplasmas, a diferencia del género *Acholeplasma* que no requiere de esteroides para su crecimiento.

La Digitonina es un glucósido que disuelve los esteroides presentes en el medio de Friis. La prueba se desarrolló realizando diluciones decimales 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} del aislado, posteriormente de cada dilución fue tomado un volumen de 20 μl para depositarlos en la superficie del medio de cultivo semisólido permitiendo que resbale la gota en línea recta. Una vez que se dejó secar fue colocado un disco de papel filtro saturado con una solución de digitonina al 1.5%, la placa fue incubada en microaerobiosis a 37°C con el 80-85% de humedad y se observó por varios días hasta observar crecimiento de colonias. Una reacción positiva se consideró al observar un halo de inhibición del crecimiento colonial alrededor del disco de digitonina (Tully 1983, Howard et al., 1994) y se diagnosticó como *Mycoplasma spp*

Cuadro 2. Medio de cultivo líquido Friis.

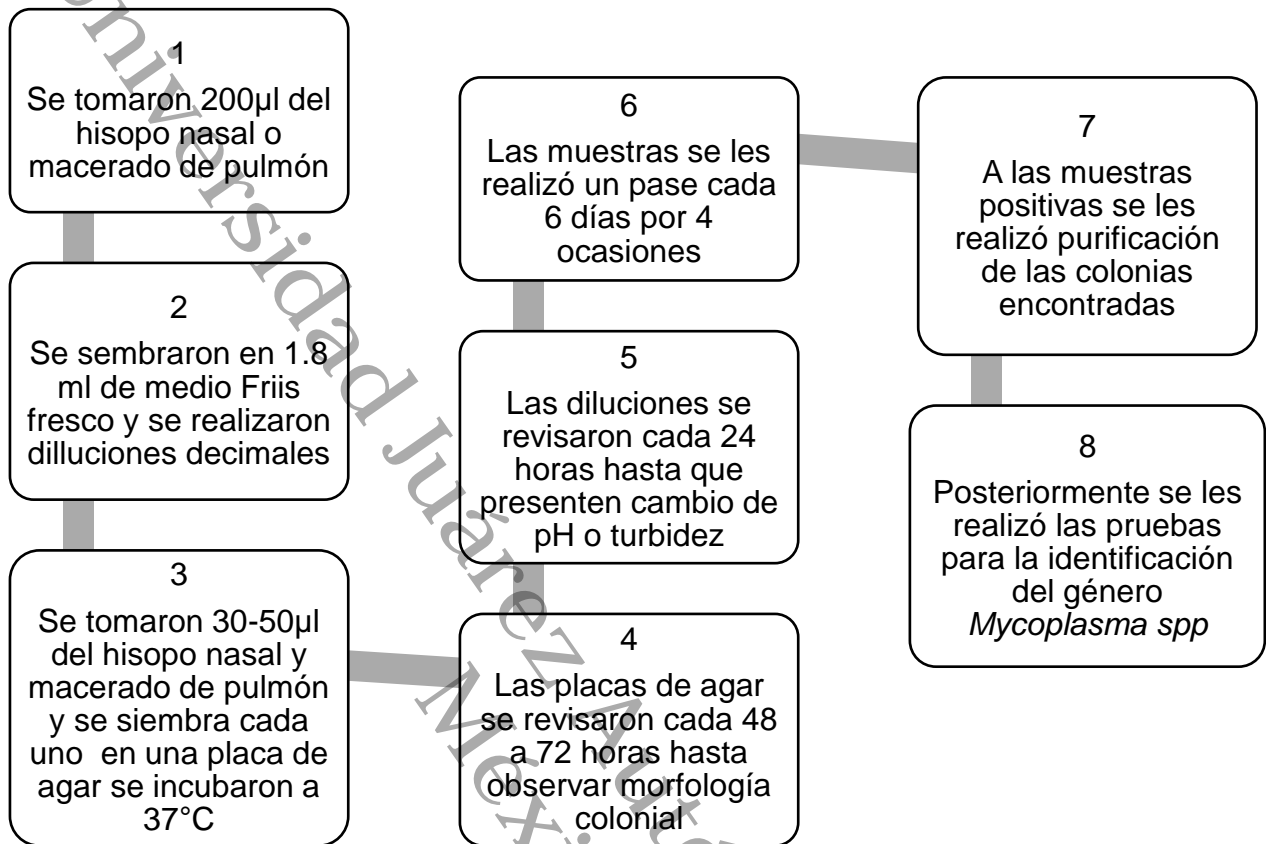
PPLO	0.55 gr
Infusión cerebro-corazón	0.55 gr
Agua destilada	117 ml
Sales de Hanks (A)	4 ml
Sales de Hanks (B)	4 ml

Esterilizar en autoclave a 121°C/ 15 lb/ 15 minutos.

Al enfriarse agregar los siguientes componentes del medio.

Suero de equino	16.5 ml
Suero de cerdo	16.5 ml
Extracto de levadura	6 ml
Rojo de fenol	0.45 ml
Penicilina	1.5 ml

Cuadro 3. Procesamiento de las muestras.



4.0 RESULTADOS

4.1. Aislamiento de colonias con morfología típica a Micoplasmas.

Los aislados con morfología de colonia típica de micoplasmas (Figura 1) fueron observados en 38 (51.3%) de las 74 muestras analizadas de hisopos nasales y pulmones. De las 55 muestras de hisopos nasales se observaron colonias en 29 (52.7%) muestras y 26 (47.2%) fueron negativas a colonias de micoplasmas (cuadro 4). De las 19 muestras de pulmón, 9 (47.3%) mostraron la presencia de colonias y 10 (52.6%) fueron negativas (cuadro 5).

En los animales a partir de las 4 semanas de edad de las dos regiones estudiadas se lograron los aislamientos de los hisopos nasales, se observó en la zona de Hidalgo un mayor porcentaje de aislados en un 76% y en Guanajuato 24% de las muestras. Con respecto a las muestras de pulmones, se observó alrededor del 47% la morfología de colonias en los cerdos en la etapa de finalización de la zona de Veracruz.

El medio de Friis y los factores de enriquecimiento, las condiciones de temperatura y requerimiento atmosférico permitieron el crecimiento de las colonias de micoplasmas, después de 5 días de incubación se observaba poca densidad de colonias, realizando pases de medio de cultivo semanal y resiembras en el medio sólido de Friis se permitió la adaptación y viabilidad del microorganismo in vitro.

Los aislados desarrollaron en el medio sólido típicas colonias de micoplasmas sin área central (punto central), y no se les observó film & spot.

Los 38 aislados mostraron colonias típicas de micoplasmas y fueron positivas a la filtrabilidad por 0.45 micras y dependencia a los esteroides por la prueba de la digitonina (Figura 2).

Todos los aislados utilizaron la glucosa como sustrato y se observó la fermentación en el medio líquido tornándose el pH ligeramente ácido. Se realizaron entre 2 y 3 pases para la mayoría de las colonias de *Mycoplasma spp* (cuadro 6).

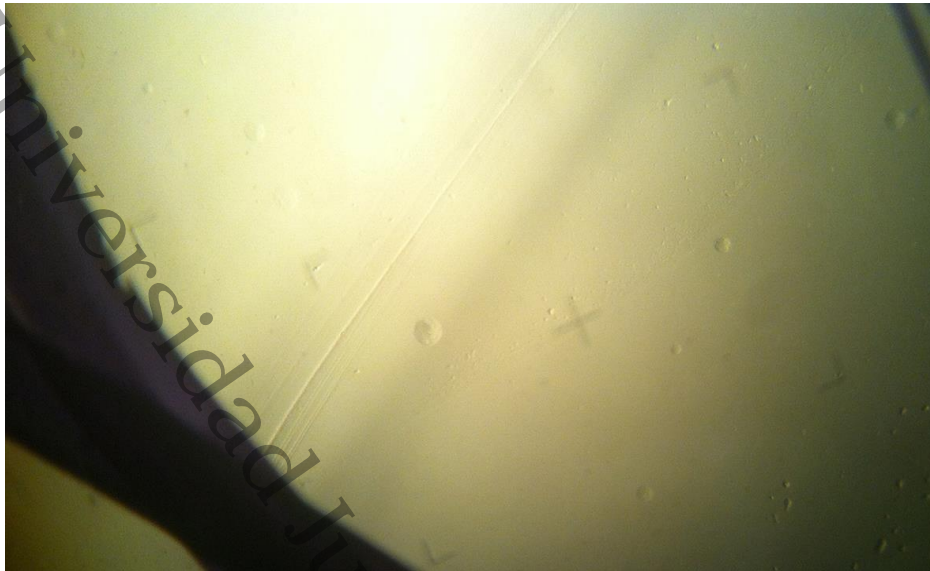


Figura 1. Colonias de *Mycoplasma spp* sin punto central aisladas de hisopo nasal y pulmón de cerdo con problemas respiratorios, aumento de 2x.

Cuadro 4. Aislamiento de colonias con morfología de micoplasma de hisopos nasales de cerdos con problemas respiratorios.

Hisopos nasales	Lugar	Morfología colonial de micoplasma		Edad
		Positivo	Negativo	
25	Otumba, Hidalgo	19 (76%)	6	4-12 semanas
30	Valle de Santiago, Guanajuato	10 (33.3%)	20	4- 8 semanas
55		29	26	4.12 semanas
		52.7 %	47.2%	

Cuadro 5. Aislamiento de colonias con morfología de micoplasma de pulmones de cerdos con lesiones respiratorias

Pulmones	Lugar	<i>Mycoplasma spp</i>		Edad
		Positivo	Negativo	
19	Xalapa, Veracruz	9	10	Finalización
		47.3%	52.6%	

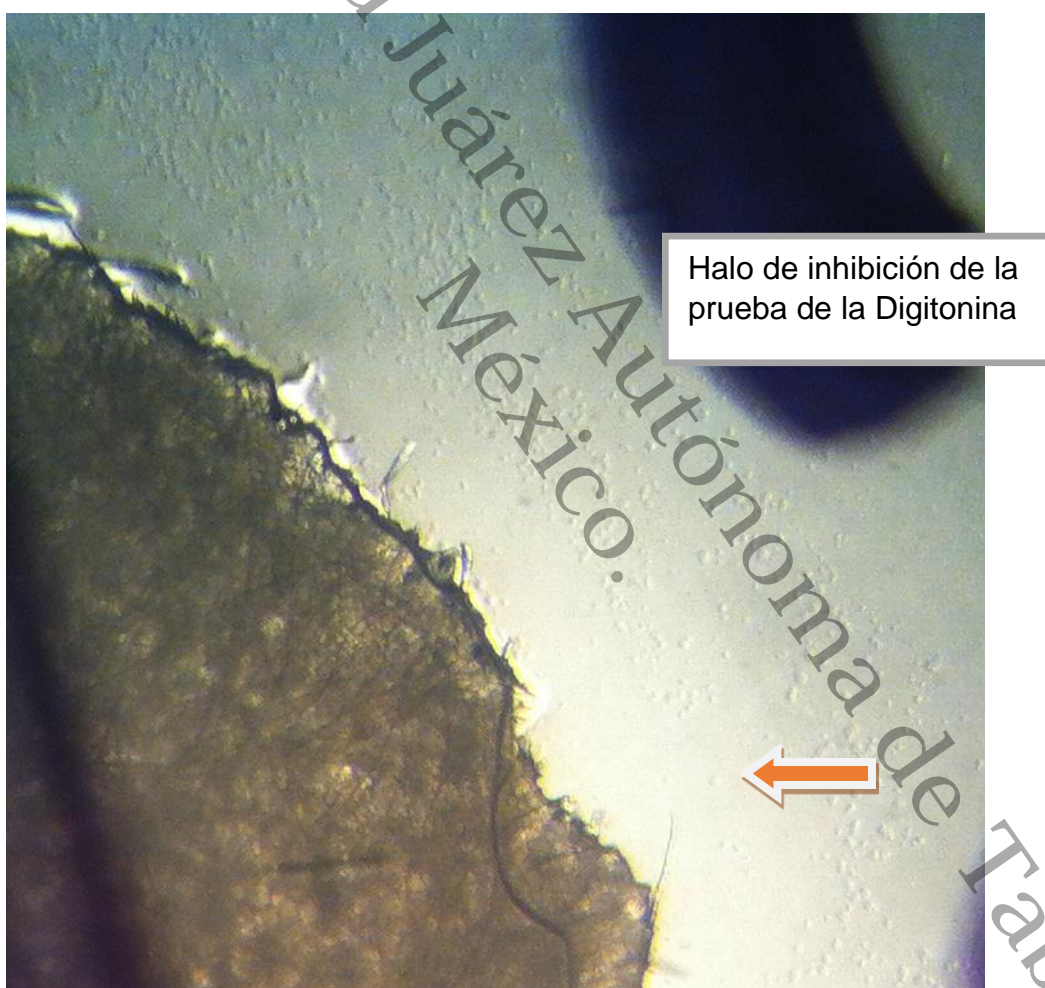


Figura 2. El halo de inhibición con la prueba de la Digitonina, identificó a *Mycoplasma spp* por la dependencia de esteroides

Cuadro 6. Resultados de las pruebas básicas de identificación para el género *Mycoplasma spp.*

	Muestras analizadas	Morfología colonial	Filtrabilidad por 0.45 micras	Digitonina
Hisopos nasales	55	29	29	29
Pulmones	19	9	9	9
Total	74	38	38	38

5.0 DISCUSIÓN

5.1. Aislamiento de *Mycoplasma spp.*

La Neumonía Enzoótica Porcina (NEP) tiene distribución mundial y se ve afectada con altas pérdidas económicas en la producción de cerdos. *Mycoplasma hyopneumoniae*, responsable de la NEP, su cultivo a partir de muestras de campo es todavía muy difícil de realizar en el diagnóstico rutinario en los laboratorios, debido a que el microorganismo requiere de diferentes nutrientes y condiciones particulares in vitro. Además, de que en las muestras podemos encontrar la presencia de otras especies de micoplasmas asociadas a la NEP, que sobrecrecen y dificultan su aislamiento. El aislamiento del microorganismo de una muestra es relevante para el diagnóstico de la enfermedad; asimismo, el aislamiento nos permitirá conocer la situación epidemiológica de la enfermedad, así como estudiar sus mecanismos de virulencia y su variación genética en la población natural en estudio.

En el presente estudio, se cultivaron 74 muestras de hisopos nasales y pulmones de cerdos con problemas respiratorios, de las regiones geográficas de Hidalgo, Guanajuato y Veracruz. Se mostró la presencia de *Mycoplasma spp* en 38 (51.3%)

muestras, los aislados presentaron morfología de colonia típica de micoplasma sin punto central en el medio sólido, filtrabilidad por 0.45 micras y no requerimiento de esteroides por medio de la prueba de la digitonina.

Se demostró la presencia de *Mycoplasma spp* en 29 (52.7%) hisopos nasales y en 9 (47.3%) pulmones de las tres regiones estudiadas, Hidalgo, Guanajuato y Veracruz mostrando 76%, 33.3% y 47.3% respectivamente. *Sibila et al* en 2014 obtuvieron una prevalencia de *M. hyopneumoniae* de (31.4%) en animales con problemas respiratorios y de *M. hyorhinis* el (54%).

En este estudio, sólo se pudo recuperar un tipo de colonia por muestra, quizás por la dificultad del aislamiento y adaptación del microorganismo in vitro. Sin embargo, en las muestras clínicas del tracto respiratorio del cerdo se ha observado la asociación de varias especies de micoplasmas como son *M. hyopneumoniae*, *M. flocculare*, *M. hyopsinoviae* y *M. hyorhinis*, estas especies son capaces de desarrollar en el mismo medio de cultivo de Friis, ya que cubre sus requerimientos nutricionales, es así que se puede aislar una sola especie o más en cultivos mixtos. Se ha reportado la capacidad que tiene *M. hyorhinis* de sobrecrecer a *M. hyopneumoniae* y enmascara el crecimiento de este último en el cultivo bacteriano y no permitir observar la morfología de Mh. La morfología de colonias sin punto central es característico de *M. hyopneumoniae* y *M. flocculare* a diferencia de *M. hyopsinoviae* y *M. hyorhinis* que muestran punto central en sus colonias.

En México, se han realizado pocos estudios de aislamiento y se ha reportado la presencia de *M. hyorhinis* en las muestras estudiadas por Miranda-Morales en 1986, que aisló de pulmones de cerdos de rastro e identificó con la prueba serológica de inhibición de crecimiento a *M. hyorhinis* con un antisuero específico. Para el 2015, *Rojas-Trejo et al* aislaron a *Mycoplasma hyorhinis* de pulmones de lechones que fueron identificados bioquímicamente. Estudios experimentales, realizados en México en el 2003 por *Ciprian et al* observaron por medio de inmunofluorescencia el epitelio bronquial de cerdos infectados con *Mycoplasma hyopneumoniae*, el evento de colonización fue observado durante los primeros 20 días post infección.

De los aislados obtenidos de pulmones de cerdo que provienen de una unidad de producción porcina en etapa de finalización, nos muestra que los pulmones positivos a *Mycoplasma spp* son de cerdos que presentaron problemas respiratorios en alguna etapa de su vida productiva, probablemente en estado crónico. El aislamiento de este microorganismo es considerado como fastidioso (*Thacker y Minion, 2010*) y se han recomendado utilizar como alternativa las metodologías moleculares para la detección del material genético de Micoplasma por medio de la PCR. Es así que, en 2014 *Sibila et al*, realizaron un estudio cuyo objetivo fue evaluar la prevalencia de *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Mycoplasma hyorhinis* en lavados broncoalveolares de muestras procedentes de animales vivos, con y sin problemas respiratorios de diferentes explotaciones europeas. Lo que obtuvieron fue una detección por PCR de *Mycoplasma hyopneumoniae* que fue mayor en aquellos animales que presentan problemas respiratorios 11/35, (31.4%) que en animales sanos 16/70, (22.8%). Sin embargo, la detección de *Mycoplasma hyorhinis* fue mayor en animales sanos 46/70, (65%) que en aquellos animales que presentan problemas respiratorios 19/34, (54%).

El objetivo de este trabajo, aislamiento de Micoplasmas asociados al complejo respiratorio porcino, es parte del proyecto de investigación Variables antigénicas de *M. hyopneumoniae* presentes en México. De los aislados obtenidos se realizará la identificación molecular y la secuenciación para cubrir los objetivos propuestos en el proyecto.

6.0 CONCLUSIONES

De las 74 muestras 38 (51.35%) fueron positivas a la presencia de colonias típicas de micoplasmas y 36 (48.64%) fueron negativas. Se observó que del total de las muestras positivas 29 (52.7%) y 9 (47.3%) fueron de hisopos nasales y pulmón respectivamente. Los aislados se identificaron como *Mycoplasma spp* con las pruebas de filtrabilidad por 0.45 micras, morfología colonial, dependencia a esteroides con la prueba de la digitonina. Observando una prevalencia de 51.35% de *Mycoplasma spp* en las muestras de hisopos nasales y pulmones de cerdos con problemas respiratorios.

Los aislados desarrollaron colonias con morfología típica de micoplasma sin punto central y mostraron filtrabilidad, dependencia a los esteroides y fermentación a la glucosa y fueron identificados como *Mycoplasma spp*, características morfológicas y bioquímicas similares a *M. hyopneumoniae*.

7.0 ABREVIATURAS

Mh: *Mycoplasma hyopneumoniae*

CRP: Complejo Respiratorio Porcino

°C: Grados centígrados

WBI: Western Blot

CPCV: Consolidación pulmonar craneoventral

UCC: Unidades cambio de color

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PRIMER: Son fragmentos complementarios que se van a unir a cada una de las dos cadenas separadas del templado de ADN

Tm: Temperatura media

pb: Pares de bases

NEP: Neumonía Enzoótica Porcina

A: Adenina

T: Timina

C: Citosina

G: Guanina

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

rpm: Revoluciones por minuto

Ag: Antígeno

8.0 REFERENCIAS

- Ameri, M., Zhou, E.M., Hsu, W.H., 2006. Western blot immunoassay as a confirmatory test for the presence of anti-*Mycoplasma hyopneumoniae* antibodies in swine serum. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 18, 198–201.
- Ameri-Mahabadi, M., Zhou, E.M., Hsu, W.H., 2005. Comparison of two swine *Mycoplasma hyopneumoniae* enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies from vaccinated pigs and field serum samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 17, 61–64.
- Andrada M, Sarradell J, Poveda BJ, André M, Herraéz P, y Fernandez A. 2002a. Utilización de anticuerpos Poli y Monoclonales en la detección Inmunohistoquímica de *Mycoplasma hyopneumoniae*. X Reunion de la Sociedad Española de Anatomía Patológica Veterinaria. Lugo España.
- Andrada M, Sarradell J, Poveda B, Perez A, Herraéz P, y Fernandez A. 2002b. Detección Inmunohistoquímica de *Mycoplasma hyopneumoniae* en Cortes en Parafina. I Congreso Rioplatense de Producción Porcina I Congreso Uruguayo de Producción Porcina y VI CAPP. Punta del Este Uruguay.
- Blood DC, Radostitis OM, and Henderson JA. 1999. Enfermedades causadas por especies de *Mycoplasmas*. *Medicina Veterinaria*. 756-771.
- Brown DR. 2010. Phylum XVI. Tenericutes Murray 1984a, 356VP (Effective publication: Murray 1984b, 33.). En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Krieg NR, Staley JT, Brown DR, Hedlund BP, Paster BJ, Ward NL, Ludwig W, Whitman WB (eds.). Springer, New York. pp 567-723.
- Browning, G.F., Marena, M.S., Noormohammadi, A.H., Markham, P.F., 2011. The central role of lipoproteins in the pathogenesis of mycoplasmoses. *Vet. Microbiol.* 153, 44–50.
- Calsamiglia, M. and Pijoan, C. 2000. Colonisation state and colostral immunity to *Mycoplasma hyopneumoniae* of different parity sows. *The Veterinary Record*, 146, 530-532.

- Calsamiglia, M., Pijoan, C., Trigo, A., 1999. Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11, 246–251.
- Ciprian, A., Cruz, T., Romero, A., Mendoza, S., Vega, M., Tortora J. 2003. Cinética de la infección experimental en cerdos con *Mycoplasma hyopneumoniae* usando inmunofluorescencia. *Vet. Méx.*, 34 (1).
- Charlebois A, Marois-Créhan C, Hélie P, Gagnon CA, Gottschalk M, Archambault M. 2014 Jan 31. Genetic diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates of abattoir pigs. *Vet Microbiol.* 168(2-4):348-56.
- Cottew GS, Breard A, DaMassa AJ, Erno H, Leach RH, Lefevre PC, Rodwell AW, Smith GR. 1987 Jun. Taxonomy of the *Mycoplasma Mycoides* cluster. *Isr J Med Sci.* (6): 632-635.
- Dos Santos LF, Sreevatsan S, Torremorell M, Moreira MA, Sibila M, Pieters M. 2015 Feb 25. Genotype distribution of *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine herds from different geographical regions. *Vet Microbiol.* 25; 175(2-4):374-81.
- Dybvig K y LeRoy LV. 1996. Molecular biology of *Mycoplasmas*. *Annu Rev Microbiol* 50: 25-27.
- Erlandson, K.R., 2005. Evaluation of three serum antibody enzyme-linked immunosorbent assays for *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Swine Health and Production* 13, 198–203.
- Estrada, E.F. 2003: Todo lo que usted quiere saber sobre *Mycoplasma hyopneumoniae*. [www.htm// Porcinocultura.com](http://www.htm//Porcinocultura.com).
- Fablet, C., Marois, C., Dorenlor, V., Eono, F., Eveno, E., Jolly, J.P., Le Devendec, L., Kobisch, M., Madec, F. and Rose, N. 2012b. Bacterial pathogens associated with lung lesions in slaughter pigs from 125 herds. *Research in Veterinary Science* 93, 627–630.
- Fano, E., Pijoan, C., Dee, S. and Deen, J. 2007. Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization at weaning on disease severity in growing pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research* 71, 195–200.

- Fraile, L., Alegre, A., López-Jiménez, R., Nofrarías, M. and Segalés, J. 2010. Risk factors associated with pleuritis and cranio-ventral pulmonary consolidation in slaughter-aged pigs. *Veterinary journal* 184, 326–333.
- Friis NF. 1972. Isolation and characterization of a new porcine mycoplasma. *Acta Vet Scand.* 13(2):284-6.
- Friis, N.F. 1975. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis pneumoniae* and *Mycoplasma flocculare*: a survey. *Nordisk Veterinær Medicin* 27, 337-339.
- Goll, Jr. F. 1994. Identification of mycoplasmas isolated from domestic animals. En: *Mycoplasmosis in animals: Laboratory Diagnosis.* Iowa State University Press/ Ames. 15-30p.
- Goodwin, R.F. 1985. Apparent reinfection of enzootic-pneumonia-free pig herds: search for possible causes. *The Veterinary Record* 116, 690-694.
- Goodwin, R.F. 1972. The survival of *Mycoplasma suis pneumoniae* in liquid medium, on solid medium and in pneumonic tissue. *Research in Veterinary Science* 13, 203-204.
- Goodwin, R.F.W., Pomeroy, A.P. and Whittlestone, P. 1965. Production of enzootic pneumonia in pigs with a mycoplasma. *The Veterinary Record* 77, 1247–1249.
- Hansen MS, Pors SE, Jensen HE, Bille-Hansen V, Bisgaard M, Flachs EM, Nielsen OL. 2010. An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. *J Comp Pathol.* Aug-Oct;143(2-3):120-31.
- Howard WW, Rosenbusch FR, Lauerman HL. 1994. *Mycoplasmosis in animals: Mycoplasmosis Committee of American association of veterinary laboratory diagnosis.* EEUU. Iowa State University Press. hyopneumoniae field isolates. In: American Association of Swine Veterinarians Annual Meeting, Des Moines, Iowa. p. 95.
- Lambert, M. 1987. Contagious agalactia of sheep and goats. En: *Mycoplasmoses of ruminants.* Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties 6(3): 699-711.

- Leman, A.D.; Straw, B.; Glock, R.D; Mengeling, W.L.; Penny, R.H.C.; Scholl, E., 2000: Diseases of Swine. Eith Edition. IOWA State University Press. pp: 469-478.
- Lin JH, Chen SP, Yeh KS, Weng CN. 2006. *Mycoplasma hyorhinis* in Taiwan: Diagnosis and isolation of swine pneumonia pathogen. *Vet Microbiol*. Jun 15;115(1-3):111-6.
- Liu, W., Feng, Z., Fang, L., Zhou, Z., Li, Q., Li, S., Luo, R., Wang, L., Chen, H., Shao, G., Xiao, S., 2011. Complete genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 168. *J. Bacteriol*. 193, 1016–1017.
- Maes, D., Segales, J., Meyns, T., Sibila, M., Pieters, M. and Haesebrouck, F. 2008a. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Veterinary Microbiology* 126, 297–309.
- Maes, D., Verdonck, M., Deluyker, H., de Kruif, A., 1996. Enzootic pneumonia in pigs. *Veterinary Quarterly* 18, 104–109.
- Mare, C.J. and Switzer, W.P. 1965. New Species: *Mycoplasma hyopneumoniae*: A causative agent of virus pig pneumonia. *Veterinary Medicine. Small Animal Clinics* 60, 841-846.
- Martinez Lobo, F y Prieto Suarez, C. 2007. Complejo Respiratorio Porcino: Aspectos más Importantes. *Producción Animal*. N° 237. 1-17.
- Martínez, J., Peris, B., Gómez, E.A. and Corpa, J.M. 2009. The relationship between infectious and noninfectious herd factors with pneumonia at slaughter and productive parameters in fattening pigs. *Veterinary journal* 179, 240–246.
- Meriardi G, Dottori M, Bonilauri P, Luppi A, Gozio S et al. 2012 Survey of pleuritis and pulmonary lesions in pigs at abattoir with a focus on the extent of the condition and herd risk factors. *Veterinary Journal*, 193, 234e239.
- Meeusen EN, Walker J, Peters A, Pastoret PP, Jungersen G. 2007. Current status of veterinary vaccines. *Clin Microbiol Rev*. Jul;20(3):489-510,
- Meyns, T., Van Steelant, J., Rolly, E., Dewulf, J., Haesebrouck, F. and Maes, D. 2011. A cross-sectional study of risk factors associated with pulmonary lesions in pigs at slaughter. *Veterinary journal* 187, 388-392.

- Minion FC, Lefkowitz EJ, Madsen ML, Cleary BJ, Swartzell S.M. Mahairas GG. 2004. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232 the agent of swine mycoplasmosis. *J. Bacteriol.* 186: 7123-7133.
- Miranda MRE 1986. Tesis Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM
- Nathues H, Beilage EG, Kreienbrock L, Rosengarten R, Spergser J. 2011 Sep 28. RAPD and VNTR analyses demonstrate genotypic heterogeneity of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates from pigs housed in a region with high pig density. *Vet Microbiol.* 152(3-4):338-45.
- Nathues, H., Chang, Y.M., Wieland, B., Rechter, G., Spergser, J., Rosengarten, R., Kreienbrock, L. and Grosse Beilage, E. 2012b. Herd-level risk factors for the seropositivity to *Mycoplasma hyopneumoniae* and the occurrence of Enzootic Pneumonia among fattening pigs in areas of endemic infection and high pig density. *Transboundary Emerging Diseases*, doi: 10.1111/tbed.12033.
- Nicholas R, Ayling Rand McAuliffe L. 2008. *Mycoplasma Diseases of Ruminants*. CABI International. Oxfordshire UK.
- Nicholas RAJ (b). 2002. Contagious Caprine Pleuropneumonia. Department of bacterial Diseases, The Veterinary Laboratories Agency, Addlestone, Surrey, UK.
- Otake, S., Dee, S., Corzo, C., Oliveira, S., Deen, J., 2010. Long-distance airborne transport of infectious PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* from a swine population infected with multiple viral variants. *Vet. Microbiol.*
- Palzer A, Ritzmann M, Wolf G, Heinritzi K. 2008. Associations between pathogens in healthy pigs and pigs with pneumonia. *Vet Rec.* Mar 1;162(9):267-71.
- Pijoan, C., 1994. Serology of *Mycoplasma hyopneumoniae*. In: Allen D. Lemans Swine Conference, St. Paul, Minnesota. p. 8.
- Poveda, BJ.; Ramírez, SA.; De la Fé, C.; Assunção, P. y Díaz-Bertrana, L. 2002. *Manual de Microbiología Veterinaria*. McGraw Hill-Interamericana. Págs: 423-430.
- Razin S and Freundt EA. 1984. The mycoplasmas. In *Bergey's manual of systematic bacteriology* vol I 9 edición. The Williams and Wikins Co. Baltimore. Pp 740-793.

- Razin S, Yogev D, Naot Y. 1998 Dec. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62(4):1094-156.
- Razin, S. 2006. The Genus *Mycoplasma* and Related Genera (Class *Mollicutes*). In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H. and Stackebrandt, E. (Eds.). *The Prokaryotes*. New York, Springer, USA, pp. 836–904.
- Rojas TV, Trigo TJF, Trujillo O M E, Beltrán F R, Maya R M, Miranda-Morales RE 2015. Aislamiento de *Mycoplasma hyorhinis* en muestras de cerdos con problemas respiratorios y articulares. *Asociación Mexicana de Veterinarios Especializados en Cerdos*.
- Ross R and Whittlestone. 1983. Comparison of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains by serological methods. *Am J Vet Res.* 44: 2087-2094.
- Ross RF, Whittlestone P. 1983. Recovery of, identification of, and serological response to porcine mycoplasmas. In: *Methods in Mycoplasmaology*. Tully JG, Razin S. (eds.). Academic Press. New York. vol 11, pp. 115-127.
- Rostagno M, Pelger G. June 8-11, 2014. Global full value pigs survey: Health. *Proceedings of the 23rd IPVS Congress, Cancun, Mexico*.
- Sibila M, Mentaberre G, Boadella M, Huerta E, Casas Díaz E, Vicente J, Gortázar C, Marco I, Lavín S, Segalés J. 2010. Serological, pathological and polymerase chain reaction studies on *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in the wild boar. *Vet Microbiol.* Jul 29; 144(1-2):214-8.
- Sibila, M., Calsamiglia, M., Vidal, D., Badiella, L., Aldaz, A. and Jensen, J. C. 2004a. Dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in 12 farms with different production systems. *Canadian journal of veterinary research* 68, 12–18.
- Sibila, M., Nofrarias, M., Lopez-Soria, S., Segales, J., Valero, O., Espinal, A., Calsamiglia, M., 2007. Chronological study of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection, seroconversión and associated lung lesions in vaccinated and non-vaccinated pigs. *Vet. Microbiol.* 122, 97-107.
- Sibila, M., Pieters, M., Molitor, T., Maes, D., Haesebrouck, F., Segales, J., 2009. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Vet. J.* 181, 221–231.
- Sibila, M., Ciprian, A., Aragon, V., Dereu, A., Segalés, J., 2014. Papel de

- Mycoplasma hyorhinis en las Neumonías del cerdo. Asociación Mexicana de Veterinarios Especializados en Cerdos.
- Simionatto, S., Marchioro, S.B., Maes, D., Dellagostin, O.A., 2013. Mycoplasma hyopneumoniae: from disease to vaccine development. Vet Microbiol. 165, 234–242.
- Stark, K.D.C., Nicolet, J., Frey, J., 1998. Detection of Mycoplasma hyopneumoniae by air sampling with a nested PCR assay. Appl. Environ. Microbiol. 64, 543–548.
- Strait, E.L., Erickson, B.Z., Thacker, E.L., 2004. Analysis of Mycoplasma
- Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ. 1999. Diseases of swine, 8th edition. Iowa State University Press, Ames.
- Taylor TK, Bashiruddin JB, Gould AR. 1992 Oct. Relationships between members of the Mycoplasma Mycoides cluster as shown by DNA probes and sequence analysis. Int J Syst Bacteriol. 42 (4): 593-601.
- Taylor, D.J. 2013. Bacterial diseases. In: Taylor, D.J. (Ed.). Pig diseases. Glasgow, UK. pp 188-198.
- Thacker EL. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. 2004. Anim Health Res Rev. Dec;5(2):317-20.
- Thacker EL. 2006. Mycoplasmal diseases. In: Leman AD, Straw BE, D'Allaire S. Mengeling WL and Taylor DJ, (Ed.) Diseases of Swine 9th ed. The Iowa State University Press Ames IA pp 701-717.
- Thacker, E.L. and Minion, F.C. 2012. Mycoplasmosis. In: Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramírez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W. (Eds.). Diseases of Swine. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA, pp. 779–797.
- Thacker, E.L., Minion, F.C., 2010. Mycoplasmosis. In: Zimmerman, J. (Ed.), Diseases of Swine. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, pp. 779-797.
- Thacker, E.L., 2004. Diagnosis of Mycoplasma hyopneumoniae. Anim. Health Res. Rev. 5, 317–320.

- Thiacourt F, Lorenzon S, David A, Breard A. 2000 Mar. Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster as shown by sequencing of a putative membrane protein gene. *Vet Microbiol* 2000 Mar 15; 72 (3-4): 251-68.
- Tully JG. 1983. Cloning and filtration techniques for *Mycoplasmas*. En: *Methods in mycoplasmaology*. Razin S y Tully JG. Estados Unidos: Academic Press, 173–177.
- Tully JG. Clyde. 1983. Senterfit. *Mycoplasma* techniques course: Preparation of *Mycoplasma* antisera. Bordeaux: International Organization for Mycoplasmaology (IOM). 1983
- Vasconcelos AT, Ferreira HB, Bizarro CV. 2005. Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. *J. Bacteriol.* 187 5568-5577.
- Vicca, J.; Stakenborg, T.; Maes, D.; Peters J. 2002 b: Antibiotic susceptibility of Belgian *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. 14th International IOM Congress, Vienna, Austria
- Vicca J, Stakenborg T, Maes D, Butaye P, Peeters J, de Kruif A, Haesebrouck F. 2003. Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Vet Microbiol.* Dec 30;97(3-4):177-90.
- Villarreal I, Maes D, Vranckx K, Calus D, Pasmans F, Haesebrouck F. 2011 Feb. Effect of vaccination of pigs against experimental infection with high and low virulence *Mycoplasma hyopneumoniae* strains. *Vaccine.* 17; 29, 1731–1735.
- Vranckx K, Maes D, Calus D, Villarreal I, Pasmans F, Haesebrouck F. 2011 May. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis is a suitable tool for differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains without cultivation. *J Clin Microbiol:* 49(5):2020-3.
- Whittlestone, P. 1973. Enzootic pneumonia of pigs (EPP). *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 17, 1-55.

Aislamiento de Mycoplasma spp en cerdos con problemas respiratorios

INFORME DE ORIGINALIDAD

10%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	www.agromeat.com Internet	177 palabras — 4%
2	accedacris.ulpgc.es Internet	154 palabras — 4%
3	core.ac.uk Internet	60 palabras — 1%
4	docplayer.net Internet	31 palabras — 1%
5	www.oalib.com Internet	24 palabras — 1%

EXCLUIR CITAS

ACTIVADO

EXCLUIR FUENTES

DESACTIVADO

EXCLUIR BIBLIOGRAFÍA

ACTIVADO

EXCLUIR COINCIDENCIAS < 20 PALABRAS