

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**



**“APLICACIÓN DE LA SEROLOGÍA PARA EL CONTROL DE
Mycoplasma hyopneumoniae EN CERDOS”**

ANDREA CHRISTINE HEGEL OLIVA

GUATEMALA, MARZO DE 2010

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE VETERINARIA**

**“APLICACIÓN DE LA SEROLOGÍA PARA EL CONTROL DE
Mycoplasma hyopneumoniae EN CERDOS”**

TESIS

**PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

POR

ANDREA CHRISTINE HEGEL OLIVA

AL CONFERÍRSELE EL GRADO ACADÉMICO DE

MÉDICA VETERINARIO

GUATEMALA, MARZO 2010

JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

DECANO	M. V. LEONIDAS AVILA PALMA
SECRETARIO	M. V. MARCO VINICIO GARCIA URBINA
VOCAL I	M. V. YERI EDGARDO VELIZ PORRAS
VOCAL II	M.V. MSc. FREDY ROLANDO GONZALEZ GUERRERO
VOCAL III	M. V. y Zoot. MARIO ANTONIO MOTTA GONZALEZ
VOCAL IV	Br. SET LEVI SAMAYOA LOPEZ
VOCAL V	Br. LUIS ALBERTO VILLEDA LANUZA

ASESORES

M. V. YERI EDGARDO VELIZ PORRAS
M. V. JACQUELINE ESCOBAR MUÑOZ
M. V. CARLOS ENRIQUE CAMEY RODAS

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

**EN CUMPLIMIENTO A LO ESTABLECIDO POR LOS ESTATUTOS DE LA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA PRESENTO A
CONSIDERACIÓN DE USTEDES EL TRABAJO DE TESIS TITULADO**

**“APLICACIÓN DE LA SEROLOGÍA PARA EL CONTROL DE
Mycoplasma hyopneumoniae EN CERDOS”**

**QUE FUERA APROBADO POR LA JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

COMO REQUISITO PREVIO A OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE

MÈDICA VETERINARIO

ACTO Y TESIS QUE DEDICO

A DIOS TODOPODEROSO

A LA SANTÍSIMA VIRGEN DE GUADALUPE

A MIS PADRES: ALFREDO HEGEL CHACON
AMALIA OLIVA DE HEGEL

A MI ESPOSO: RAMÓN EDUARDO OSORIO RODAS

A MI HIJA: GEORGINA OSORIO HEGEL

A MIS ABUELOS: ALFREDO HEGEL (+), OLGA CHACON DE HEGEL (+)
JORGE OLIVA (+), CARMEN CASTRO CONDE DE OLIVA (+)

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

A LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

A MIS ASESORES: DR. YERI VELIZ
DRA. JACQUELINE ESCOBAR
DR. CARLOS CAMEY

A MIS CATEDRÁTICOS

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS DE PROMOCIÓN

AGRADECIMIENTOS

A MIS PADRES: gracias por darme todo su apoyo durante mi carrera

A MI ESPOSO: mil gracias por todo, te amo mi amor.

A MI HIJA: por ser mi razón de vivir, todo lo que hago es por ti mi vida.

A MAGNOLIA: gracias por tu amistad incondicional.

A MIS ASESORES DE TESIS, por su asesoramiento, paciencia y amistad a lo largo de la realización de mi tesis.

A MIS CATEDRÁTICOS: por haber compartido sus conocimientos conmigo y por su amistad.

A MIS AMIGOS

INDICE

I.	INTRODUCCIÒN	1
II.	OBJETIVOS	3
	2.1 General	3
	2.2 Específicos	3
III.	REVISIÒN DE LITERATURA	4
	3.1 Neumonía Enzoótica Porcina	4
	3.2 Etiología	4
	3.3 Epidemiología	5
	3.4 Patogénesis	7
	3.5 Signos Clínicos	8
	3.6 Lesiones	9
	3.6.1 Lesiones Macroscópicas	9
	3.6.2 Lesiones Microscópicas	9
	3.7 Diagnóstico	10
	3.7.1 Signos Clínicos	10
	3.7.2 Análisis Microbiológicos	10
	3.7.3 Lesiones	10
	3.7.4 Pruebas Serológicas	10
	3.8 Aplicación de la serología	11
	3.8.1 Monitoreo o seguimiento de la enfermedad clínica	12
	3.8.2 Evaluación serológica de animales de reemplazo	12
	3.8.3 Evaluación de la eficiencia de la vacuna	13
	3.8.4 Diseño de programas de vacunación	13
	3.8.5 Perfiles serológicos para determinar la situación de la Neumonía Enzoótica Porcina en una zona geográfica	13
	3.8.6 Erradicación de la enfermedad	14
	3.9 Limitaciones de la serología	14
	3.10 Prueba de ELISA (Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas)	14
	3.10.1 Tipos de ELISA	15
	3.10.1.1 ELISA indirecto	15

	3.10.1.2	ELISA competitivo o bloqueador	15
	3.10.1.3	ELISA directo o captura del antígeno	16
3.11		Espectrofotometría	16
3.12		Diagnóstico diferencial	17
3.13		Control	17
	3.13.1	Vacunación	17
	3.13.2	Programas de manejos	19
	3.13.3	Medicación	19
IV.		MATERIALES Y MÉTODOS	20
4.1		Materiales	20
	4.1.1	Recursos Humanos	20
	4.1.2	Recursos de Laboratorio	20
	4.1.3	Recursos de Campo	21
	4.1.4	Recursos Biológicos	21
	4.1.5	Centros de Referencia	21
4.2		Métodos	22
	4.2.1	Diseño del Estudio	22
	4.2.2	Area del Estudio	22
	4.2.3	Kit para la detección de anticuerpos frente a <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	23
	4.2.3.1	Descripción y principios	23
	4.2.3.2	Contenido del kit IDEXX ELISA	23
	4.2.3.3	Reactivos	25
	4.2.3.4	Material necesario no suministrado en el kit	25
	4.2.3.5	Equipo para realizar ELISA	26
	4.2.3.6	Preparación de las muestras	26
	4.2.3.7	Preparación de la solución de lavado	26
	4.2.3.8	Procedimiento del análisis	27
	4.2.3.9	Resultados	27
	4.2.3.10	Cálculos	28
	4.2.3.11	Interpretación de los resultados	28
	4.2.4	Método estadístico	29

V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
VI.	CONCLUSIONES	34
VII.	RECOMENDACIONES	35
VIII.	RESUMEN	36
IX.	BIBLIOGRAFÍA	37
X.	ANEXOS	40

I. INTRODUCCIÓN

La Neumonía Enzoótica Porcina es una enfermedad respiratoria crónica causada por el *Mycoplasma hyopneumoniae* que afecta únicamente a los cerdos. Esta enfermedad se encuentra distribuida a nivel mundial considerándose como el mayor causante de pérdidas económicas. Infecta hasta el 90% de la piara y causa lesiones a nivel pulmonar. La enfermedad es altamente contagiosa, reduce la eficiencia de la conversión alimenticia y predispone a los cerdos a una neumonía aguda, produciendo tos improductiva, disminución de la tasa de crecimiento y una baja mortalidad. Sin embargo, una infección a nivel de campo comúnmente se complica con bacterias y virus invasores secundarios, haciendo así que la enfermedad sea mucho más severa y difícil de controlar.

Se han utilizado una amplia variedad de antibióticos y la aplicación de la vacuna contra *Mycoplasma hyopneumoniae* para tratar de prevenir el desarrollo de la enfermedad. Estos se usan comúnmente cuando se presentan situaciones como el movimiento y mezcla de animales o tratamiento cuando se presenta la enfermedad clínica aguda. La Neumonía Enzoótica puede estar asociada con otros micoplasmas, virus y/o bacterias, causando así el Complejo Respiratorio Porcino (CRP), siendo el *Mycoplasma hyopneumoniae* considerado el de mayor importancia.

Los perfiles serológicos desempeñan un papel importante en el seguimiento y mantenimiento del nivel de salud de las poblaciones porcinas. Estos perfiles serológicos se utilizan para el seguimiento clínico de enfermedades, para determinar los niveles de salud en una granja, para manejar las estrategias de introducción de animales de reposición y para evaluar planes de vacunación.

En el siguiente trabajo se realizaron muestreos de sangre de cerdos no vacunados de distintas edades a las cuales se les realizó la prueba serológica de ELISA en donde se determinó la presencia de anticuerpos contra *Mycoplasma hyopneumoniae* en las pias.

Esta investigación contribuye a conocer la importancia de la serología para la detección del *Mycoplasma*. De esta manera se podrá dar un mejor manejo y control en las granjas porcinas para prevenir la Neumonía Enzoótica Porcina, ya que al realizar un muestreo en la granja se podrá determinar el momento óptimo para aplicar la bacterina.

II. OBJETIVOS

2.1 GENERAL

- Contribuir al control del *Mycoplasma hyopneumoniae* en granjas porcinas.

2.2 ESPECIFICOS

- Determinar los niveles de anticuerpos contra *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos de granjas tecnificadas por medio de la prueba de ELISA.
- Determinar la edad apropiada para la aplicación de la bacterina contra *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos.

III. REVISIÒN DE LITERATURA

3.1 NEUMONÌA ENZOÒTICA PORCINA

La Neumonía Enzoótica Porcina es una enfermedad crónica del aparato respiratorio de los cerdos que se manifiesta por tos persistente en las piaras afectadas. Este es el patógeno respiratorio bacteriano de mayor importancia económica en la porcicultura, ya que produce grandes pérdidas económicas. *Mycoplasma hyopneumoniae* es una bacteria que se encuentra distribuida a nivel mundial y se encuentra presente en más del 90% de las granjas de todo el mundo (1, 2, 3, 5, 7, 9, 12, 13, 14, 18).

La Neumonía Enzoótica Porcina también se conoce como Neumonía Micoplásmica o Micoplasmática (5).

Esta enfermedad presenta una baja mortalidad, pero produce un gran impacto en los parámetros productivos en los cerdos de engorde, ya que disminuye la ganancia media diaria y la eficiencia de la conversión alimenticia (3).

Frecuentemente está asociado con otros patógenos respiratorios de los porcinos, especialmente *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis* y *Bordetella bronchiseptica*. Todos ellos pueden incrementar la severidad de la infección (3, 13, 18).

3.2 ETIOLOGÌA

Mycoplasma hyopneumoniae es el agente etiológico de la Neumonía Enzoótica Porcina. Esta es una bacteria pequeña, pleomórfica, filtrable y difícil de aislar, que infecta únicamente a los cerdos (5, 6, 14, 18).

Se caracteriza por no poseer pared celular y por esta razón se considera un microorganismo lábil y muy susceptible a la lisis mediada por anticuerpos. También el

hecho de no tener pared celular explica el por que existe resistencia a los antibióticos beta-lactámicos, ya que éstos interfieren con el metabolismo de la pared (3, 6, 7, 15).

Mycoplasma hyopneumoniae es un microorganismo que se localiza exclusivamente en la superficie de las vías respiratorias, adherido a la punta de los cilios. Por esta razón es difícil estimular al sistema inmune para provocar una respuesta adecuada para poder eliminar al microorganismo (3).

3.3 EPIDEMIOLOGÍA

La transmisión de *M. hyopneumoniae* a cerdos susceptibles normalmente se produce por contacto directo de las secreciones del tracto respiratorio de los cerdos infectados. Por lo general, los lechones son infectados por la madre poco después del nacimiento o al momento del destete cuando son mezclados con otros cerdos. También puede ingresar la enfermedad a una granja a través de la introducción de animales infectados o latentemente infectados. En los sistemas de producción continua, *M. hyopneumoniae* y otros microorganismos patógenos del sistema respiratorio pueden ser transmitidos de animales de mayor edad a los más jóvenes. Cuando un animal tose, puede diseminar la bacteria hasta 12 pies de distancia (3, 6, 7, 13, 15, 18).

Los cerdos portadores son la principal fuente de infección con *M. hyopneumoniae*. Los signos de *M. hyopneumoniae*, usualmente se observan a partir de las 6 semanas de edad, aunque la infección con *M. hyopneumoniae* se presenta principalmente en maternidad. El establecimiento de las lesiones requiere un tiempo más largo. La diseminación de la enfermedad generalmente es lenta y muchos cerdos pueden no manifestar evidencias de la enfermedad, hasta que tienen de 3 a 6 meses de edad. Los elementos que contribuyen a elevar la incidencia de *M. hyopneumoniae* en la etapa de crecimiento y finalización de los cerdos son la difusión lenta del microorganismo entre las camadas, el incremento de la densidad de los animales, la diseminación de otros agentes infecciosos y factores ambientales (18).

Existen tres mecanismos por los que la infección de *M. hyopneumoniae* se mantiene en una granja:

- transmisión de madres infectadas a lechones
- de lechones infectados a otros no infectados en las parideras y salas de transición
- de animales de engorde a otros más jóvenes que entran en instalaciones infectadas (2, 3, 6, 7, 13).

Las pérdidas económicas asociadas con *M. hyopneumoniae* son el resultado de la interacción entre infecciones bacterianas y *M. hyopneumoniae*, deficiencias en el manejo y condiciones ambientales adversas. Entre los factores ambientales se pueden mencionar la densidad, alimentación, concentración de amoníaco, ventilación y volumen de aire, temperatura y condiciones de las instalaciones (7, 18).

En una granja que ya se encuentra contaminada con *M. hyopneumoniae*, la mortalidad es causada principalmente por infecciones secundarias, no directamente por el micoplasma sino que a través de una inmunosupresión causando una infección secundaria que puede provocar la muerte (1, 9).

Comúnmente, una o más bacterias secundarias afectan a los pulmones infectados por *M. hyopneumoniae*, causando así una bronconeumonía purulenta. Las bacterias secundarias más comunes son *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Bordetella bronchiseptica* y *Actinomyces pyogenes* (1, 5, 7, 9, 12, 14).

En estudios realizados alrededor del mundo acerca del impacto económico del micoplasma han concluido que la ganancia diaria de peso vivo podría reducirse en un promedio de 7% y la conversión alimenticia podría aumentarse en un 14% (9).

3.4 PATOGÉNESIS

El período de incubación puede ser de 10 a 16 días bajo condiciones naturales; sin embargo, se han reportado duraciones variables. En las etapas tempranas de la infección, un gran número de micoplasmas han sido detectados a través del microscopio electrónico así como por pruebas de inmunofluorescencia. Estos se han observado principalmente en la superficie epitelial de la tráquea, bronquios y bronquiolos. El camino de *M. hyopneumoniae* refleja una distribución broncogénica de la infección, comprometiendo la capacidad de limpieza mucociliar. Las membranas del micoplasma en mitosis, puede causar daño citotóxico al mecanismo de defensa respiratorio y esto puede facilitar el establecimiento de la infección (1, 2, 15, 18).

El *M. hyopneumoniae* penetra la capa mucosa y se adhiere a los cilios, colonizando el epitelio respiratorio de la cavidad nasal y de las vías respiratorias. Como resultado de la colonización, se forma un aglutinamiento y se produce la pérdida de cilios y una excesiva producción de moco por la parte de las células causando una disfunción del aparato mucociliar y reducción de la eliminación pulmonar de las partículas inhaladas (6, 14).

La transmisión de *M. hyopneumoniae* se da principalmente por contacto directo con secreciones respiratorias de cerdos portadores. La eliminación de *M. hyopneumoniae* en secreciones nasales es mayor en animales con neumonía clínica durante la infección aguda (las primeras semanas de tos) y después decrece gradualmente. La neumonía clínica por *Mycoplasma* raramente se desarrolla antes de las 6 semanas de edad y la prevalencia aumenta en cerdos de crecimiento y finalización (14).

Las prácticas de manejo reducen la transmisión de microorganismos de la cerda a los lechones y de cerdos infectados a cerdos negativos. El sistema "todo dentro todo fuera" de las maternidades combinado con una edad de destete máxima de 20 días reduce la transmisión de la hembra al lechón. El sistema "todo dentro todo fuera" en el destete y en el engorde también reduce la transmisión de cerdo a cerdo al no permitir el contacto con cerdos mayores infectados (14).

Las lesiones iniciales son bronquitis y bronquiolitis. Estas lesiones estimulan una hiperplasia de las células secretoras de moco en la mucosa y una pérdida de los cilios de las vías aéreas. La reacción inflamatoria se difunde hacia el alveolo causando alveolitis y neumonía. Posteriormente se produce una hiperplasia del tejido linfoide alrededor de las vías aéreas y de los vasos sanguíneos adyacentes. El moco se incrementa y la presión del tejido linfoide alrededor de las vías aéreas interfiere con la función móvil del epitelio ciliado y se hace menos eficiente la limpieza del moco y exudado de las vías aéreas. La infección de bacterias secundarias contribuye a la bronconeumonía. La ocurrencia de casos de neumonía micoplásmica frecuentemente se presentan como una mezcla de infecciones en la cual se encuentran involucrados micoplasmas, bacterias, virus y nemátodos (18).

3.5 SIGNOS CLÍNICOS

El principal signo clínico es la tos no productiva, persistente y crónica. El principio de la enfermedad es gradual con tos continua por varias semanas o meses, aunque algunos cerdos pueden manifestar o no una pequeña tos. La intensidad de la tos es mayor en cerdos en la etapa de crecimiento y finalización. Puede ocurrir la muerte de los cerdos entre 4 y 6 meses de edad debido a infecciones bacterianas secundarias y estrés (14, 18).

Cuando la neumonía no se encuentra complicada con otro patógeno, se pueden observar signos como pelo hirsuto, alteraciones en la ganancia diaria de peso y conversión alimenticia, aparte de la tos no productiva. Cuando la neumonía se complica con otros patógenos se puede presentar pirexia (40.5 a 41° C), letargia, disnea, cianosis y muerte (5, 13, 14, 15).

3.6 LESIONES

3.6.1 Lesiones Macroscópicas

Estas consisten en áreas de consolidación de color grisáceas a púrpura. Las lesiones son casi siempre en la porción ventral de los lóbulos craneal y medio, el lóbulo accesorio, y la porción craneal del lóbulo craneal. En los estadios tempranos y medios de la enfermedad existen usualmente exudado catarral en las vías aéreas. Los nódulos linfáticos bronquial y mediastínico se encuentran frecuentemente agrandados (3, 5, 13, 18).

No existen lesiones patognomónicas (13).

Cuando las lesiones son agudas, las porciones afectadas de los pulmones se encuentran edematosas, de color gris pálido y pobremente demarcadas por tejido pulmonar normal. Cuando las lesiones son subagudas, las lesiones se observan de color púrpura oscuro, presenta atelectacia y están claramente demarcadas de tejido pulmonar adyacente. Cuando las lesiones son crónicas, se observan fisuras estrechas ramificadas compuestas por porciones atelectácicas del pulmón (14).

3.6.2 Lesiones Microscópicas

Las lesiones microscópicas son características y se centran en las vías aéreas. Los cilios del epitelio se encuentran aglutinados o ausentes. En las lesiones tempranas existen acumulaciones pequeñas de neutrófilos en la luz y alrededor de las vías aéreas así como en los alvéolos. Se puede observar infiltración linfocitaria en la adventicia de las arteriolas y vénulas y alrededor de las vías aéreas. Cuando la enfermedad progresa, hay un incremento de linfocitos en los tejidos perivascular, peribronquial y peribronquiolar así como en la lámina propia de las vías aéreas. El alveolo puede contener eosinófilos y un número incrementado de células mononucleares y polimorfonucleares (3, 14, 18).

3.7 DIAGNÓSTICO

3.7.1 Signos Clínicos

Los signos clínicos que pueden ayudar a sospechar de *M. hyopneumoniae* incluyen tos crónica no productiva, retardo en el crecimiento y baja mortalidad (9, 18).

3.7.2 Análisis Microbiológico

Mycoplasma hyopneumoniae es uno de los micoplasmas más difíciles de aislar e identificar. Su crecimiento es lento y frecuentemente suprimido por el crecimiento más rápido de *M. hyorhinis*, un invasor secundario común de la neumonía porcina. Aunque los métodos de aislamiento han sido mejorados y muchos laboratorios han desarrollado la capacidad de aislar al organismo, el diagnóstico por cultivo no es factible en muchas situaciones, ya que se requiere de un caldo de cultivo especial que contiene suero porcino negativo a los anticuerpos de *M. hyopneumoniae* (1, 3, 6, 7, 9, 11, 13, 14, 18).

3.7.3 Lesiones

El diagnóstico se puede basar en las lesiones típicas macro y microscópicas, siendo éstas observadas únicamente al momento de realizar necropsias de los cerdos enfermos y enviando muestras de pulmón a patología, aunque ninguna lesión es patognomónica de la enfermedad (1, 3, 7, 11)

3.7.4 Pruebas serológicas

Las pruebas serológicas se realizan para demostrar la presencia del antígeno *M. hyopneumoniae* en las vías respiratoria, siendo este antígeno de *Mycoplasma* más abundante en las lesiones agudas. Los métodos serológicos de diagnóstico que se pueden realizar son:

- ELISA (Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas)
- Hemaglutinación indirecta
- Anticuerpos fluorescentes
- Fijación de complemento
- PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
- Inmunofluorescencia indirecta
- Aglutinación en látex
- Inmunohistoquímica (1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 13, 14, 18).

Las pruebas serológicas son las únicas técnicas para detectar la infección de *M. hyopneumoniae* en animales vivos dentro de una explotación, aunque puede presentar ciertas limitaciones, ya que el largo período de tiempo entre la infección y la seroconversión y el índice variable de seroconversión hace que el uso de la serología para determinar el momento de la infección sea difícil, ya que puede ser tardía y variable (3, 6, 11).

Utilizando la prueba de ELISA, se pueden detectar anticuerpos maternos en lechones de hasta 7 semanas de edad. La vacunación de las cerdas antes del parto puede prolongar el tiempo en el que se detectan los anticuerpos maternos en los lechones (13).

3.8 APLICACIÓN DE LA SEROLOGÍA

Las pruebas serológicas se han estado utilizando para determinar el estado de salud de poblaciones porcinas alojadas en sistemas de producción tecnificadas. Para realizar estas pruebas se necesita de una muestra de sangre y luego se realizan las pruebas de laboratorio rápidamente. De esta manera se puede llevar a cabo el control y la prevención de las enfermedades. Las pruebas serológicas son fundamentales para el monitoreo y mantenimiento de la salud de las granjas porcinas (10).

Las principales aplicaciones de la serología son las siguientes:

3.8.1 Monitoreo o seguimiento de la enfermedad clínica

La mayoría de las enfermedades respiratorias en porcinos son de origen multifactorial, sobretodo en la fase de crecimiento y engorde. La manifestación clínica de la enfermedad se da por la interacción entre los problemas de manejo y los agentes infecciosos. Cuando se identifica un grupo de animales afectados y se les realiza serología, se puede determinar el momento en que está ocurriendo la infección con los agentes patógenos y la relación con la aparición de los signos clínicos. Se realizan pruebas serológicas para detectar el momento de la infección en granjas afectadas con *Mycoplasma hyopneumoniae* (10).

En el caso de la Neumonía Enzoótica Porcina, la persistencia de los anticuerpos maternos se ha estimado en 3 semanas en lechones, hijos de madres no vacunadas. Es por eso que en granjas con flujo continuo se sugiere que la vacunación no se inicie antes de las 4 a 5 semanas de edad, ya que puede haber posibilidad de interferencia con los anticuerpos maternos (10).

La inducción de anticuerpos contra *Mycoplasma* mediante la vacunación tiende a ser lenta y la seroconversión se hace evidente hasta 2 semanas después de la segunda vacunación. Los anticuerpos declinan rápidamente entre 4 y 5 semanas después de la vacunación. El desafío natural de los cerdos vacunados resulta entonces en una respuesta que conlleva un incremento evidente en los títulos de anticuerpos (10).

3.8.2 Evaluación serológica de animales de reemplazo

Se recomienda realizar pruebas serológicas a todos los animales de reemplazo que van a ingresar a una granja para conocer sus niveles de anticuerpos durante su período de aislamiento antes de mezclarlos con los demás cerdos de la granja. Por esta razón se

debe conocer el estado sanitario de la granja de donde se van a adquirir a los cerdos y conocer si estos han sido vacunados o no (10).

3.8.3 Evaluación de la eficiencia de la vacuna

Mediante el uso de la serología se puede evaluar la respuesta vacunal. Depende del tipo de vacuna, ya que los niveles de anticuerpos pueden ser o no ser buenos indicadores de inmunidad. O sea, que si se espera un nivel alto de anticuerpos como respuesta a una vacuna, el perfil serológico proporciona un nivel sobre la calidad de la vacuna. O al contrario, si se encuentra por debajo de los niveles esperados de la respuesta vacunal puede que exista una interferencia con los anticuerpos maternos cuando se vacunan animales muy jóvenes, que haya una deficiencia en el manejo de la vacuna o que haya una incapacidad de los animales vacunados a responder adecuadamente a la vacuna (10).

3.8.4 Diseño de programas de vacunación

Realizar pruebas serológicas son de utilidad para determinar el momento apropiado para la aplicación de productos biológicos o vacunas como agentes profilácticos. El catabolismo de los anticuerpos se puede estudiar en el tiempo para determinar cuando han declinado para garantizar una respuesta activa seguida a la aplicación vacunal. De esta manera se puede establecer cuando se debe de aplicar los refuerzos vacunales para que de esta manera se mantenga protegida la población animal (10).

3.8.5 Perfiles serológicos para determinar la situación de la Neumonía Enzoótica Porcina en una zona geográfica

Para determinar la prevalencia de las principales enfermedades infecciosas de los cerdos, es una de las mayores aplicaciones de la serología, ya que de esta manera se puede conocer el grado de difusión y las causas sobre la diseminación de estos problemas. También se pueden mantener programas de vigilancia epidemiológica activa

para conocer así la dinámica de las infecciones en el campo. Estas pruebas serológicas se realizan periódicamente para conocer la prevalencia de reactores positivos (10).

3.8.6 Erradicación de la enfermedad

Realizar pruebas serológicas de individuos y de grupos de animales es la base para los programas de prevención, control y erradicación. De esta manera, la serología ha sido de mucho apoyo para el seguimiento epidemiológico de brotes de campo (10).

3.9 LIMITACIONES DE LA SEROLOGÍA

Las pruebas serológicas tienen ciertas limitaciones ya que no sirven para:

- estimar el grado de protección vacunal,
- entender la dinámica de la infección en granjas vacunadas,
- entender el grado de protección debido a la inmunidad celular (10).

3.10 PRUEBA DE ELISA (Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas)

ELISA es una prueba rápida utilizada para detectar y cuantificar anticuerpos o antígenos contra virus, bacterias y otros materiales. Esta prueba se puede utilizar para detectar varios agentes infecciosos que afectan a animales de producción como rumiantes, equinos, cerdos y aves (4).

La fase sólida de ELISA se realiza en una placa de poliestireno con 96 fosos y otros materiales. La función de la fase sólida es inmovilizar el antígeno (Ag) o anticuerpo (Ac). El Ag o Ac se une a la fase sólida, se incuba y luego la placa es lavada para remover cualquier material no adherido, se añade un conjugado y se incuba nuevamente (4).

El conjugado consiste en un Ag o Ac que ha sido rotulado con la enzima. La porción inmunológicamente reactiva de la unión conjugada con la fase sólida depende del formato de la prueba. La porción de la enzima del conjugado permite la detección (4).

Las placas son lavadas y luego se añade un sustrato enzimático (peróxido de hidrógeno y cromógeno) y se incuba. El color se desarrolla en la presencia de la enzima ligada y la densidad óptica que es leída por un lector de placas para ELISA (4).

3.10.1 Tipos de ELISA

La prueba de ELISA se divide en 3 tipos:

3.10.1.1 ELISA indirecto

El anticuerpo de la muestra es encerrado como "sandwich" entre el antígeno cubierto en la placa y el conjugado antiglobulina con enzimas. La adición del sustrato enzimático con cromógeno hace que se desarrolle el color. Este color es directamente proporcional a la cantidad de Ac en la muestra. A mayor presencia de Ac en la muestra, más fuerte se desarrolla el color. Este formato se utiliza para determinar el nivel total de Ac en una muestra (ej. IBR, Neumonía Enzoótica Porcina, New Castle) (4, 8).

3.10.1.2 ELISA competitivo o bloqueador

En esta prueba, los anticuerpos específicos compiten con la enzima o bloquean la enzima específica de los Ac en el conjugado. La adición del sustrato enzimático y el cromógeno causa el desarrollo del color. El color es inversamente proporcional a la cantidad existente de anticuerpos en la muestra. A mayor cantidad de Ac presentes en la muestra, menor será el color desarrollado en los fosos de la placa (4, 8).

3.10.1.3 ELISA directo o captura del antígeno

El antígeno de la muestra es encerrado como "sandwich" entre los anticuerpos cubiertos en la placa y el conjugado con enzima. El conjugado con el anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal. La adición del sustrato enzimático y el cromógeno hace que se desarrolle el color. El color es directamente proporcional a la cantidad de patógenos presentes en la muestra (4, 8).

3.11 ESPECTROFOTOMETRÌA

La espectrofotometría es el método cuantitativo de análisis químico que utiliza la luz para medir la concentración de las sustancias químicas. Es un método de análisis óptico que se utiliza en las investigaciones biológicas. El espectrofotómetro es el instrumento que se usa para comparar la radiación que se transmite o absorbe por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto y una que tiene una cantidad conocida de la misma sustancia. (17)

Los espectrofotómetros de reflectancia miden la cantidad proporcional de luz reflejada por una superficie como una función de las longitudes de onda para producir un espectro de reflectancia. El funcionamiento de un espectrofotómetro consiste básicamente en iluminar la muestra con luz blanca y calcular la cantidad de luz que refleja dicha muestra en una serie de intervalos de longitudes de onda. (16)

La forma en que funciona el espectrofotómetro consiste en iluminar la muestra con una luz blanca para luego calcular la cantidad de luz reflejada en la muestra en una serie de intervalos de longitud de onda. Estos valores se recogen 31 intervalos de longitud de onda que van de de 400 nm hasta 700 nm. Esto se hace pasando la luz a través de un dispositivo monocromático que fracciona la luz en distintos intervalos de longitud de onda. (16)

La reflectancia de una muestra se expresa como una fracción entre 0 y 1, o como un porcentaje entre 0 y 100. Los valores de reflectancia obtenidos son valores relativos. (16)

3.12 DIAGNÒSTICO DIFERENCIAL

La Neumonía Enzoótica Porcina se debe diferenciar de otras enfermedades respiratorias que afectan a los cerdos como:

- Neumonía causada por *Bordetella bronchiseptica*
- Enfermedad de Glässer
- *Haemophilus pleuropneumonia*
- Rinitis Atrófica Infecciosa
- Parásitos pulmonares
- Influenza Porcina
- Pasteurelosis
- Neumonía por *Klebsiella* (3, 7, 10).

3.13 CONTROL

El control de la Neumonía Enzoótica Porcina es posible con:

- Vacunación
- Programas de manejo
- Medicación (3, 7).

3.13.1 Vacunación

La vacunación va a depender de la edad a la cual los cerdos entran en contacto con el microorganismo y con el nivel de inmunidad materna en el momento de la vacunación. De

esta manera se puede reducir la neumonía y las pérdidas económicas ocasionadas por el *M. hyopneumoniae*. Se deben tener ciertos criterios para vacunar:

- la presencia de *M. hyopneumoniae* en la explotación
- el nivel continuo de la enfermedad respiratoria
- infecciones primarias y secundarias asociadas
- carga bacteriana intensa
- necesidad de medicación continua en el alimento
- crecimiento lento o variable
- problemas respiratorios
- mortalidades desde el destete a matadero superiores al 4%
- costos de la vacunación (13).

No se tiene claro cuando es el momento óptimo para la vacunación. La vacunación temprana es preferible en aquellas situaciones en que se produce una colonización y transmisión precoz por *M. hyopneumoniae*, aunque la vacunación durante la primera semana de vida presenta el grave inconveniente de que los niveles de anticuerpos maternos se encuentran altos a esta edad y por lo tanto, se produce interferencia con la inmunización activa. Pero si se retrasa la vacunación, se corre el riesgo de que no se alcancen a tiempo la protección, sobretodo cuando se utiliza la vacuna de dos dosis. Por esta razón es que las vacunas que protegen con una sola dosis permiten retrasar la vacunación hasta el destete sin perder rapidez en el inicio de la protección (7, 13, 15).

Tampoco se tiene claro si se debe o no vacunar a las cerdas gestantes, ya que los lechones de cerdas vacunadas elaboran títulos de anticuerpos más bajos cuando se vacunan mientras todavía tienen títulos de anticuerpos maternos, por lo que se sugiere que estos lechones deberían vacunarse más tardíamente (13).

Existen vacunas inactivadas que requieren la aplicación de dos dosis (vacunación y revacunación) y se deben administrar con un intervalo de 3 a 4 semanas para inducir una respuesta inmune completa. La primera dosis pone en marcha la respuesta del sistema inmunitario y la segunda dosis la potencializa hasta los niveles suficientemente

protectivos. Existen también vacunas con un adyuvante más desarrollado, el cual permite la vacunación con una sola dosis, la cual produce una respuesta inmune más potente y completa que la obtenida con adyuvantes tradicionales (13).

3.13.2 Programas de manejo

Es importante la mejora en el manejo, ya que se deben corregir los factores de riesgo para las enfermedades respiratorias como la rotación y la calidad del aire, variaciones de temperatura, una adecuada ventilación, reduciendo la cantidad de polvo y evitando el estrés. También es importante una buena nutrición. El objetivo de esto es llegar a utilizar solamente la vacunación, ya que la preocupación de los productores, profesionales y consumidores de carne de cerdo son los residuos de medicamentos y productos químicos, ya que se está exigiendo una buena calidad de carne (5, 7, 9).

Muchas veces la erradicación es la mejor opción, pero es muy difícil de llevarla a cabo tanto práctica como económicamente, ya que al volver a poblar se puede reinfectar rápidamente (2, 3).

3.13.3 Medicación

Los antibióticos que han mostrado ser altamente eficientes son:

- Tiamulina
- Lincomicina
- Tilosina
- Quinolonas
- Espectinomicina
- Tetraciclinas (6, 7).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIALES:

4.1.1 Recursos Humanos:

- Trabajadores de campo
- Personal de laboratorio
- Investigadora o estudiante

4.1.2 Recursos de Laboratorio:

- Kit IDEXX ELISA
 - Placas tapizadas con Ag inactivados
 - Diluyente de la muestra
 - Controles positivo y negativo
 - Solución de lavado: tampón de fosfato conservado con gentamicina
 - Conjugado antiporcino
 - Sustrato TMB
 - Solución de interrupción
- Tips o puntas
- Micropipetas de 5, 10, 100, 240 μ l
- Placas de poliestireno para diluir las muestras
- Agua destilada
- Lector de ELISA
- Computadora

4.1.3 Recursos de Campo:

- Algodón
- Alcohol
- Tubos de ensayo con tapón
- Jeringas de 5 cc
- Agujas No. 21x1 ½ y 18x1 ½
- Ropa de trabajo (overol)
- Gradilla
- Papel mayordomo
- Hielera
- Refrigerante / hielo
- Maskin tape
- Crayón / Lapicero
- Instalaciones
- Ficha de recopilación de datos

4.1.4 Recursos Biológicos:

- 84 muestras de suero sanguíneo de cerdos de distintas edades

4.1.5 Centros de Referencia:

- Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala
- Biblioteca de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala

4.2 MÉTODOS:

4.2.1 Diseño del Estudio:

El presente trabajo de investigación se realizó en granjas de cerdos tecnificadas en dos distintos departamentos de la República de Guatemala, Zacapa y Chimaltenango. Estas granjas fueron escogidas por conveniencia, ya que en éstas no se realiza la vacunación y que realizaron la prueba serológica de ELISA, para analizar la presencia de anticuerpos contra *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Se escogieron cerdos de engorde de distintas edades al azar, de 1 a 20 semanas de edad. Se tomaron muestras de sangre de la vena yugular o de la carótida y éstas se colocaron en tubos de ensayo. Luego se colocaron los tubos en un ángulo de 45° y se esperó a que se separara el coágulo y así se obtuvo el suero sanguíneo. Se colocaron en una gradilla y se transportaron en refrigeración. Todas las muestras se identificaron de acuerdo a la edad. Las muestras se llevaron al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala para realizarles la prueba indirecta de ELISA.

4.2.2 Area de Estudio:

Zacapa: El departamento de Zacapa se encuentra situado en la región Nor-Oriente de Guatemala. Limita al Norte con los departamentos de Alta Verapaz e Izabal; al Sur con los departamentos de Chiquimula y Jalapa; al Este con el departamento de Izabal y la República de Honduras; y al Oeste con el departamento de El Progreso. Su cabecera departamental es Zacapa. Se encuentra a una altura de 220 msnm. Su clima es cálido, con temperatura máxima de 34° C y mínima de 21° C.

Chimaltenango: El departamento de Chimaltenango se encuentra situado en la región Central de Guatemala. Limita al Norte con los departamentos de El Quiché y Baja

Verapaz; al Este con Guatemala y Sacatepéquez; al Sur con Escuintla y Suchitepéquez; y al Oeste con Sololá. La cabecera departamental es Chimaltenango. Se encuentra a una altura de 1800 msnm. Su clima es de templado a frío.

4.2.3 Kit para la detección de anticuerpos frente a *Mycoplasma hyopneumoniae*:

HerdChek M.hyo es un inmunoanálisis enzimático de IDEXX diseñado para la detección de anticuerpos frente a *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*) en suero y plasma de porcino (6).

El kit ELISA de detección de anticuerpos frente a *M. hyopneumoniae* permite una determinación rápida de la presencia de anticuerpos frente a este microorganismo, lo cual puede ser un indicativo de exposición al agente (6).

4.2.3.1 Descripción y principios:

Este análisis está diseñado para medir la concentración relativa de anticuerpos frente a *M. hyopneumoniae* en suero porcino. Los 96 fosos de la placa están tapizados con antígeno de *M. hyopneumoniae*. Tras la incubación de la muestra en el foso tapizado, los anticuerpos específicos frente a *M. hyopneumoniae* presentes en la muestra se fijan a la placa, formando un complejo antígeno-anticuerpo (Ag-Ac). Las fracciones no fijadas se eliminan mediante lavado y se añade un conjugado anti-porcino marcado con peroxidasa que se unirá a los anticuerpos presentes. El conjugado no unido se elimina mediante lavado y se agrega a los fosos un sustrato enzimático. El cambio de color resultante está directamente relacionado con la cantidad de anticuerpos frente a *M. hyopneumoniae* presentes en la muestra (6).

4.2.3.2 Contenido del kit IDEXX ELISA:

- Placa tapizada con antígenos (Ag) inactivados: esta placa está hecha de poliestireno con 96 fosos y está cubierta con un Ag o Ac inactivado específico. Esta cubierta es el sitio

donde se va a llevar a cabo la unión de los Ag en la muestra. Los Ag que no se unan a la muestra serán lavados luego de la incubación.

- Diluyente de la muestra: la mayoría de las pruebas requieren de una dilución específica de la muestra. Para esto se utiliza una solución buffer.

- Controles: los controles positivos y negativos son soluciones que contienen antígenos. Estos controles ayudan a normalizar o estandarizar las placas y también son utilizados para validar las pruebas y calcular los resultados de las muestras. En la mayoría de los kits, los controles están pre diluidos y listos para usar.

- Solución de lavado: esta solución es un buffer de fosfatos y detergente para lavar cualquier material que no se haya adherido a la placa.

- Conjugado: son enzimas ligadas a Ac o Ag que reaccionan específicamente en la placa con la muestra. El conjugado que no tuvo unión es lavado luego de la incubación y antes de adicionar el sustrato. La densidad óptica del sustrato colorimétrico es directamente proporcional a la cantidad de enzimas ligadas presentes.

- Sustrato: para conjugados de peroxidasa, el sustrato es una mezcla de peróxido de hidrógeno y cromógeno que reaccionan a la porción de la enzima del conjugado para producir el color.

- Solución de interrupción o solución bloqueadora: esta solución detiene la reacción sustrato-enzima y luego se va a desarrollar el color (4).

4.2.3.3 Reactivos:

Reactivos	Volumen
Placas tapizadas con <i>M. hyopneumoniae</i>	5
Conjugado anti-porcino: HRPO. Contiene gentamicina como conservante.	60 ml
Control Positivo de <i>M. hyopneumoniae</i> . Suero porcino reactivo frente a <i>M. hyopneumoniae</i> en tampón fosfato con estabilizantes protéicos. Contiene azida de sodio como conservante.	4 ml
Control Negativo Porcino. Suero porcino no reactivo frente a <i>M. hyopneumoniae</i> en tampón fosfato con estabilizantes protéicos. Contiene azida de sodio como conservante.	4 ml
Diluyente de las muestras: tampón con estabilizadores de proteína. Conservado con azida de sodio.	235 ml
Concentrado de lavado (10X): tampón de fosfato conservado con gentamicina.	235 ml
Sustrato TMB	60 ml
Solución de interrupción	60 ml

(6).

4.2.3.4 Material necesario no suministrado en el kit:

- Pipetas de precisión o dispositivos para pipeteado múltiple con puntas de pipeta desechables
- Lector para placas de 96 fosos
- Placas para diluir las muestras
- Agua destilada o desionizada
- Sistema de lavado automático, semiautomático o manual (6).

4.2.3.5 Equipo para realizar ELISA:

El equipo que se utiliza para realizar ELISA es el siguiente:

- Pipetas: estas pueden ser unicanal, multicanal (8 a 12 canales), semiautomáticas o automáticas.
- Sistema de lavado: éste es manual que lava una columna a la vez.
- Lector de ELISA: éste es semiautomático que lee una placa a la vez (4).

4.2.3.6 Preparación de las muestras:

Diluir las muestras a 1:40 con el diluyente de muestras antes de efectuar el análisis, es decir, diluir 10 µl de la muestra con 390 µl de diluyente. Los controles NO se deben de diluir. Se debe de cambiar las puntas de las pipetas cada vez que se tome una muestra y se deben de mezclar bien las muestras diluidas antes de añadirlas a la placa tapizada con antígeno. Anotar siempre la posición de cada muestra en la placa usando una hoja de trabajo (6).

4.2.3.7 Preparación de la solución de lavado:

Dejar que la solución de lavado alcance la temperatura ambiente 20° - 27° C y mezclarlo para garantizar la disolución de sales precipitadas. La solución de lavado concentrado debe diluirse en una proporción de 1:10 con agua destilada o desionizada antes de ser empleada (ej. 30 ml de concentrado en 270 ml de agua por placa a utilizar) (6).

4.2.3.8 Procedimiento del análisis:

Dejar que los reactivos alcancen la temperatura ambiente y luego agitarlos suavemente por inversión y con un movimiento circular.

- a) Tomar la(s) placa(s) tapizada(s) con antígeno y anote la posición de las muestras en una hoja de trabajo.
- b) Añadir 100 µl de control negativo no diluido en los fosos A1 y B1.
- c) Añadir 100 µl de control positivo no diluido en los fosos C1 y D1.
- d) Añadir 100 µl de la muestra diluida en los fosos correspondientes.
- e) Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- f) Aspirar el contenido líquido de todos los fosos y depositarlos en un recipiente de desperdicios adecuado.
- g) Lavar cada foso de tres a cinco veces con unos 350 µl de solución de lavado. Aspirar completamente.
- h) Añadir 100 µl de conjugado anti-porcino:peroxidasa a cada foso.
- i) Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- j) Repetir los pasos f y g.
- k) Añadir 100 µl de la solución de sustrato TMB en cada foso.
- l) Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- m) Añadir 100 µl de solución de interrupción o bloqueadora en cada foso.
- n) Calibrar el lector en blanco con aire.
- o) Medir y anotar los valores de absorbancia a 650 nm, A(650) (6, 8).

4.2.3.9 Resultados:

Para que el ensayo sea válido, la diferencia entre la absorbancia promedio del control positivo y del control negativo ($CP_x - CN_x$) debe ser mayor o igual de 0.150. La absorbancia promedio del control negativo debe ser menor o igual a 0.150. La presencia o ausencia de anticuerpos frente a *M. hyopneumoniae* se determina por medio de una relación entre el valor de A(650) de la muestra con el promedio del control positivo. El

control positivo está normalizado y representa concentraciones significativas de anticuerpos frente a *M. hyopneumoniae* en el suero y plasma de porcino. La concentración relativa de anticuerpos de la muestra se determina a través del cálculo del cociente de la absorbancia de la muestra (M) con respecto a la del control positivo (P), M/P. Los títulos finales se calculan a partir de la ecuación que se encuentran más adelante en la sección de cálculos (6).

4.2.3.10 Cálculos:

- Promedio del control negativo (CNx):

$$\frac{A(650) \text{ foso A1} + A(650) \text{ foso B1}}{2} = \text{CNx}$$

- Promedio del control positivo (CPx):

$$\frac{A(650) \text{ foso C1} + A(650) \text{ foso D1}}{2} = \text{CPx}$$

- Cociente M/P:

$$\frac{A(650) \text{ de la muestra} - \text{CNx}}{\text{CPx} - \text{CNx}} = \text{M/P}$$

- Título. Relacione el cociente M/P en una dilución de 1:40 con el título final:

$$\text{Log}_{10} \text{ del título} = 1.09 (\text{log}_{10} \text{ M/P}) + 3.36 \quad (6).$$

4.2.3.11 Interpretación de los resultados:

- Las muestras con coeficientes M/P menores de 0.3 se consideran negativas dentro de los límites de la prueba.
- Si la relación M/P es mayor o iguales de 0.3 y menor o iguales de 0.4, entonces consideramos la muestra dudosa de anticuerpos frente a *M. hyopneumoniae*.
- Las muestras con coeficientes M/P mayores de 0.4 se consideran positivas (6).

4.2.4 Método estadístico:

El método estadístico utilizado fue la Prueba de Chi cuadrado, para determinar si existió diferencia entre las dos granjas.

Se utilizó la siguiente fórmula:

$$X^2 = \sum \frac{(\text{resultados observados} - \text{resultados esperados})^2}{\text{resultados esperados}}$$

Se realizó una serie cronológica con los resultados, con el objetivo de determinar cuál es la mejor edad para aplicar la bacterina.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la realización del presente trabajo de investigación se evaluaron 2 granjas porcinas, una en Zacapa (granja A) y la otra en Chimaltenango (granja B), en las cuales se tomaron un total de 84 muestras.

A todas las muestras se les realizó la prueba de ELISA para evaluar que porcentaje de positivos, negativos y sospechosos en cada granja y se evaluaron los niveles de anticuerpos contra *M. hyopneumoniae*.

Las 84 muestras de suero fueron evaluadas por la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos contra *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Para considerar negativa una muestra, debe tener una absorbancia menor a 0.299. Para considerarla sospechosa entre 0.300 y 0.400 y para considerarla positiva debe ser mayor a 0.401 (ver tabla 1).

GRANJA A:

En la granja A se eligieron al azar 3 lechones por semana de edad comprendidos de la semana 1 a la 10 de nacidos. El mismo procedimiento se llevó a cabo con cerdos de las semanas 12, 14, 16 y 18 de edad. El total de muestras en esta granja fue de 42 (ver cuadro No. 1).

Estadísticamente existe una diferencia altamente significativa entre los resultados a la prueba de ELISA y las diferentes edades de los cerdos, usando la prueba de Chi cuadrado. Los títulos de anticuerpos obtenidos a la prueba de ELISA se puede observar en la tabla No. 1.

El 53% de los animales muestreados en la Granja A (22/42) resultaron positivos a la lectura de la prueba de ELISA, 46% resultaron negativos y un 1% fueron sospechosos (ver cuadro No.6).

En las primeras cuatro semanas de vida todos los lechones muestreados presentaron un nivel de anticuerpos a *Mycoplasma hyopneumoniae* altos, por lo que se pueden asociar a que éstos son transferidos a través del calostro, de la madre al lechón.

Estos cerdos permanecieron con un alto nivel de anticuerpos maternos hasta aproximadamente las cuatro semanas de vida, donde ya se empieza a ver una disminución de éstos. La seroconversión ocurre a partir de la semana 10 y el mayor índice de seroconversión se produce entre las semanas 14 y 16 (ver gráfica No. 1).

GRANJA B:

En la granja B se eligieron al azar 3 lechones por semana de edad comprendidos de la semana 1 a la 10 de nacidos. El mismo procedimiento se llevó a cabo con cerdos de las semanas 12, 14, 16 y 18 de edad. El total de muestras en esta granja fue de 42 (ver cuadro No. 2).

Estadísticamente existe diferencia altamente significativa entre los resultados a la prueba de ELISA y las diferentes edades de los cerdos usando la prueba de Chi cuadrado. Los títulos de anticuerpos obtenidos a la prueba de ELISA se observan en la tabla No. 2.

El 88% de los animales muestreados en la Granja B (37/42) resultaron positivos a la lectura de la prueba de ELISA y el 12% resultaron negativos (ver cuadro No.6).

En esta granja se mantuvo una positividad en todas las edades, ya que en todas las edades muestreadas se encontraron casos positivos. Hubo muy poca negatividad y se puede atribuir a que estos cerdos en las primeras semanas de vida tuvieron anticuerpos

maternos calostrales con anticuerpos contra *Mycoplasma hyopneumoniae* y luego se fueron infectando con el micoplasma desde muy tempranas semanas de vida por lo que en sus sistemas siempre estuvo circulando el micoplasma produciendo anticuerpos (ver gráfica 2).

En ambas granjas se pudo observar animales seropositivos desde la primera semana de vida, esto indica que hubo una transferencia de anticuerpos maternos a los lechones ya que sus madres no estaban vacunadas contra *Mycoplasma hyopneumoniae*.

MUESTREO POR EDADES:

Se demostró serológicamente mediante una prueba comercial de ELISA la infección con *Mycoplasma hyopneumoniae*. Por la naturaleza del agente es difícil precisar el momento exacto de la infección mediante la serología, pero la prueba es eficaz para demostrar la exposición al agente y la edad en la cual los animales sufrieron el mayor grado de exposición, por lo que se ha podido evaluar el estado inmunitario de la piara.

Existe un alto nivel de anticuerpos contra *Mycoplasma hyopneumoniae* al nacimiento y una seropositividad del 100% de los lechones hasta la cuarta semana de vida. Esto es debido a una alta tasa de transferencia de los anticuerpos calostrales de la madre al lechón. Esto demuestra la actividad del agente en el área de reproducción, ya que estas cerdas no se encuentran vacunadas. La mitad de los animales empezaron a seroconvertirse a partir de la novena semana, por lo que el período crítico para la infección fue entre la quinta y octava semana. Ya al final de la etapa del engorde (después de la semana 16) los anticuerpos contra *Mycoplasma hyopneumoniae* se han incrementado más que en las semanas anteriores.

La inmunidad materna previene a los lechones del desarrollo de lesiones mientras es expuesto al contagio. Sin embargo, cuando la mayor parte de estos animales ya no contaron con la inmunidad materna, el agente se hizo más intenso y los cerdos empezaron a seroconvertirse unas semanas después. A partir de la cuarta semana, los

lechones comenzaron a quedar desprotegidos de los anticuerpos calostrales y es allí cuando comenzaron a contraer la infección. En este momento es cuando se recomienda la vacunación.

Se podría decir que los animales fueron infectados en la etapa de lactancia, manteniendo colonizadas las vías aéreas y que no pudieron ser eliminadas por la inmunidad materna.

Para determinar el momento óptimo de la vacunación es necesario tener en cuenta la presencia de la inmunidad materna al momento de la aplicación. En este estudio se puede determinar aplicar la vacuna a partir de la cuarta semana de vida.

Existen factores ambientales y de manejo de las granjas que contribuyen al desarrollo del micoplasma. Es importante el manejo de la ventilación, la calidad del aire, una buena limpieza y eliminación de heces y orina y evitar el estrés. Por eso se recomienda el uso del sistema "Todo dentro, todo fuera" para asegurarse que no se ingresó ningún animal a los lotes durante el engorde.

Debido a que la Neumonía Enzoótica Porcina es un enfermedad endémica a nivel mundial, la cual causa muchas pérdidas económicas a los porcicultores, se debe de realizar pruebas serológicas periódicamente para la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae* en las piaras, ya que de esta manera se puede evaluar el estado inmunitario de las granjas. En nuestro medio existen laboratorios que realizan estas pruebas y son muy confiables. La serología nos permite determinar la infección dentro de una población, con la demostración de la seroconversión siendo una forma segura de diagnosticar la infección en animales vivos.

VI. CONCLUSIONES

1. La prueba de ELISA es una prueba serológica muy confiable para la detección de anticuerpos contra *Mycoplasma hyopneumoniae*, ya que permite determinar la exposición al agente y la edad en la cual sufre la mayor exposición a éste. También permite evaluar el estado inmunitario de una piara.
2. Los títulos de anticuerpos mostró una diferencia altamente significativa en ambos grupos.
3. En las primeras semanas de vida de los lechones hay una alta positividad que puede estar asociada a la interferencia de anticuerpos maternos, la cual va disminuyendo entre la tercera y cuarta semana de vida.
4. A partir de la tercera semana los lechones quedan desprotegidos de anticuerpos contra *Mycoplasma hyopneumoniae*, por lo que se encuentran más propensos a contraer la infección.
4. El momento óptimo para aplicar la bacterina sería a partir de la cuarta semana de vida que es donde ya hay un descenso de los anticuerpos maternos.
5. La inmunización de los cerdos con una bacterina contra el micoplasma permite que los animales adquieran una inmunidad protectora que impida que desarrollen la enfermedad y que obtengan mayores ganancias de peso, una edad más temprana para el beneficio y mejores tasas de conversión alimenticia.

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar periódicamente muestreos serológicos para conocer la presencia y el comportamiento de la enfermedad dentro de la granja, así como la exposición al agente.
2. Utilizar sistema "todo dentro, todo fuera", con una estricta limpieza, desinfección y períodos de descanso de las instalaciones entre lotes.
3. Realizar vacunación contra *Mycoplasma hyopneumoniae* en el período óptimo para inducir una respuesta inmune temprana sin la interferencia de los anticuerpos maternos y así poder disminuir las lesiones y síntomas respiratorios causados por el *Mycoplasma hyopneumoniae*.

VIII. RESUMEN

El presente trabajo fue realizado en dos granjas en dos distintos departamentos de la República de Guatemala, muestreando 42 cerdos de diferentes edades en cada una. Se les realizó un sangrado para luego tomar el suero y realizar la prueba de ELISA para determinar los anticuerpos contra *Mycoplasma hyopneumoniae* de estos animales.

En ambas granjas se encontró una diferencia altamente significativa al realizar la prueba de Chi cuadrado. Por lo que no existe ninguna relación entre la infección contra *Mycoplasma hyopneumoniae* y la edad de los animales.

Se pudo determinar que estos animales tenían anticuerpos contra *Mycoplasma hyopneumoniae* desde los primeros días de vida por lo que se asocia con la inmunidad materna, los cuales los fueron perdiendo alrededor de la cuarta semana de vida, pero como éstos no fueron vacunados contrajeron la infección y volvieron a desarrollar anticuerpos.

A partir de la quinta semana, los anticuerpos comenzaron a descender por lo que los cerdos quedaron expuestos a contraer el micoplasma. El período crítico para contraer la enfermedad se dio entre la quinta y octava semana de edad, por lo que el momento óptimo para la vacunación contra *Mycoplasma hyopneumoniae* es a partir de la cuarta semana de vida.

Es muy importante la realización periódica de muestreos para el diseño de programas de vacunación, cambios en el manejo y bioseguridad en la granja, elaborar estrategias para el control y la prevención de la enfermedad y determinar la salud inmunológica de la piara. Existe en nuestro medio laboratorios muy confiables para la realización de la prueba de ELISA.

IX. BIBLIOGRAFIA

- 1) Abeledo, MA. et al 2005. Detección de anticuerpos frente a *Mycoplasma hyopneumoniae* en crías porcinas mediante ELISA competitivo (en línea). Revista Salud Animal. Vol 27, No. 1, p. 21-25. Cuba. Consultado 20 dic. 2008. Disponible en <http://www.censa.edu.cu/Revistas/rsa/v27n1/abeledo1.pdf>
- 2) Bachmann, V. et al 2006. Dinámica de la infección con *Mycoplasma hyopneumoniae* en porcinos provenientes de madres con y sin antecedentes de inmunización (en línea). Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. Volumen 17 No. 1, p. 51-57. Perú. Consultado 20 dic 2008. Disponible en <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v17n1/a09v17n1.pdf>
- 3) Calsamigua, M. 2004. *Mycoplasma hyopneumoniae*: epidemiología y control (en línea). Unidad de Histología y Anatomía Patológica. Departamento de Anatomía y Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona. Consultado 12 jun.2006. Disponible en http://www.colvet.es/Infovet/jun01/ciencias_v/articulo1.hatm
- 4) ELISA Technology. 2006 (en línea). Consultado 5 jul. 2006. Disponible en <http://www.idexx.com/production/elisa/>
- 5) Enzootic Pneumonia of Pigs. s.f. (en línea). Consultado 25 jun. 2006. Disponible <http://www.spc.int/rahs/Manual/Porcine/ENZOOTICPNEUMONNIAE.HTM>
- 6) Herdchek* *Mycoplasma hyopneumoniae* Antibody Test Kit. 2006. (en línea). Consultado 1 jul. 2006. Disponible en: <http://www.idexx.com/production/swine/swine5.jsp>
- 7) Lobo, E. et al 2005. *Mycoplasma hyopnuemoniae* y su relación con los procesos respiratorios del cerdo (en línea). Revista Electrónica de Veterinaria. Vol VI, No. 10.

Consultado 20 dic. 2008. Disponible en <http://www.veterinaria.org/revista/redvet/n101005/100510.pdf>

8) Lopez, M. et al 2008. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), Prueba Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (en línea). Disponible en <http://hsjd08.files.wordpress.com/2008/05/elisa.ppt>

9) *Mycoplasma* – Pneumonia Enzoótica 1ª parte. s.f. (en línea). Consultado 23 jun. 2006. Disponible en: <http://www.acontece.com.ar/0328.htm>

10) Mogollón, JD. s.f. Aplicaciones de la serología para el diagnóstico y control de las enfermedades porcinas en América Latina (en línea). Consultado 15 jul. 2006. Trabajos Seleccionados. Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario. Medicina Porcina. Instituto Colombiano Agropecuario ICA, Colombia. Consultado 15 jul. 2006. Disponible en <http://www.avancesentecnologiaporcina.com/contenidos/serolmay1.htm>

11) *Mycoplasma hyopneumoniae*: Diagnóstico e inmunidad. s.f. (en línea). Consultado 12 jun. 2006. Disponible en <http://www.e-campo.com/sections/news/display.php/uuid.3EDC199B-0ED7-4E96-B590369C5DCDEA27/>

12) Respiratory diseases – enzootic pneumonia. 2006 (en línea). Consultado 25 jun 2006. Disponible en <http://www.tiamutin.com/vetpig/respiratory/enzpneu/en/index.shtml>

13) Salleras, JM. s.f. Qué sabemos actualmente sobre la infección causada por *Mycoplasma hyopneumoniae*? (en línea). Trabajos seleccionados. España. Consultado 15 jun. 2006. Disponible en <http://www.avancesentecnologiaporcina.com/contenidos/micosep4.htm>

14) Stevenson, GW. 1999. La neumonía bacteriana en cerdos, parte 1 (en línea). Consultado 12 jun. 2006 Disponible en: <http://www.acontece.com.ar/0144.htm>

- 15) Swine Diseases (Chest) – Mycoplasma Pneumonia. s.f. (en línea). Universidad del Estado de Iowa. Estados Unidos de Norteamérica. Consultado 1 jul. 2006. Disponible en <http://www.vetmed.iastate.edu/departments/vdpam/swine/diseases/chest/mycoplasmapneumonia/>
- 16) Westland, S. 2001. Espectrofotómetros de reflectancia. (en línea). Consultado 4 feb. 2009. Disponible en <http://www.gusgsm.com/> funciona_espectrofotometro_reflectancia
- 17) Wikipedia. 2008. Espectrofotómetro. (en línea). Consultado 4 feb. 2009. Disponible en <http://es.wikipedia.org/wiki/Espectrofotometr%C3%ADa>
- 18) Williams, J deJ. 2002. Efecto del uso de antibióticos en casos clínicos de enfermedades del tracto respiratorio sobre la ganancia de peso en cerdos de engorda (en línea). Consultado 6 jun. 2006. Mar. 2002. Disponible en http://digeset.ucol.mx/tesis_posgrado/Pdf/Jose%20de%20Jesus%20Williams.pdf

X. ANEXOS

TABLA No. 1

Cálculo de los títulos de los anticuerpos contra *Mycoplasma hyopneumoniae* utilizando los rangos del control positivo (M/P):

$$\text{Título Log}_{10} = 1.09 \times \text{Log}_{10}(\text{M/P}) + 3.36$$

Título = antilog de título Log_{10}

Rangos de los anticuerpos M/P	Rangos de los títulos de los anticuerpos	Grupos de los títulos de los anticuerpos	Interpretación de ELISA
0.000 – 0.299	0 – 616	0	Negativo
0.300 – 0.400	617 – 843	1	Sospechoso
0.401 – 1000	844 – 2290	2	Positivo
1.001 – 1500	2291 – 3564	3	Positivo
1501 – 2000	3565 – 4877	4	Positivo
2001 – 2500	4878 – 6220	5	Positivo
2501 – 3000	6221 – 7587	6	Positivo
3001 – 3500	7588 – 8975	7	Positivo
3501 – 4000	8976 – 10381	8	Positivo
4001 – 4500	10382 – 11803	9	Positivo
>4500	>11803	10	Positivo

Los títulos de los anticuerpos y los grupos de los títulos permiten una fácil interpretación de los datos como una ayuda en el manejo de una granja (6).

CUADRO No. 1

Títulos de anticuerpos y resultados obtenidos a la prueba de ELISA contra *Mycoplasma hyopneumoniae* en la Granja A.

Edad	O.D.	Resultado	Edad	O.D.	Resultado
1 semana	0.705	Positivo	9 semanas	0.091	Negativo
1 semana	0.719	Positivo	9 semanas	0.220	Positivo
1 semana	0.755	Positivo	9 semanas	0.086	Negativo
2 semanas	0.661	Positivo	10 semanas	0.100	Negativo
2 semanas	0.769	Positivo	10 semanas	0.081	Negativo
2 semanas	0.770	Positivo	10 semanas	0.452	Positivo
3 semanas	0.421	Positivo	12 semanas	0.149	Negativo
3 semanas	0.487	Positivo	12 semanas	0.102	Negativo
3 semanas	0.518	Positivo	12 semanas	0.410	Positivo
4 semanas	0.485	Positivo	14 semanas	0.091	Negativo
4 semanas	0.456	Positivo	14 semanas	0.731	Positivo
4 semanas	0.211	Positivo	14 semanas	0.383	Sospechoso
5 semanas	0.086	Negativo	16 semanas	0.098	Negativo
5 semanas	0.196	Positivo	16 semanas	0.618	Positivo
5 semanas	0.074	Negativo	16 semanas	0.211	Positivo
6 semanas	0.129	Negativo	18 semanas	0.486	Positivo
6 semanas	0.099	Negativo	18 semanas	0.588	Positivo
6 semanas	0.204	Positivo	18 semanas	0.119	Positivo
7 semanas	0.149	Negativo			
7 semanas	0.094	Negativo			
7 semanas	0.162	Negativo			
8 semanas	0.084	Negativo			
8 semanas	0.093	Negativo			
8 semanas	0.129	Negativo			

CUADRO No. 2

Títulos de anticuerpos y resultados obtenidos a la prueba de ELISA contra *Mycoplasma hyopneumoniae* en la Granja B.

Edad	O.D.	Resultado	Edad	O.D.	Resultado
1 semana	0.595	Positivo	10 semanas	0.451	Positivo
1 semana	0.973	Positivo	10 semanas	0.074	Negativo
1 semana	0.740	Positivo	12 semanas	0.747	Positivo
2 semanas	0.600	Positivo	12 semanas	0.951	Positivo
2 semanas	0.544	Positivo	12 semanas	0.129	Negativo
2 semanas	0.817	Positivo	14 semanas	0.091	Negativo
3 semanas	0.481	Positivo	14 semanas	0.347	Positivo
3 semanas	0.242	Positivo	14 semanas	0.600	Positivo
3 semanas	0.789	Positivo	16 semanas	1.333	Positivo
4 semanas	0.251	Positivo	16 semanas	1.441	Positivo
4 semanas	0.488	Positivo	16 semanas	0.461	Positivo
4 semanas	0.498	Positivo	18 semanas	0.487	Positivo
5 semanas	1.044	Positivo	18 semanas	0.500	Positivo
5 semanas	0.804	Positivo	18 semanas	0.488	Positivo
5 semanas	0.481	Positivo			
6 semanas	0.100	Negativo			
6 semanas	0.211	Positivo			
6 semanas	0.410	Positivo			
7 semanas	0.487	Positivo			
7 semanas	0.204	Positivo			
7 semanas	0.452	Positivo			
8 semanas	0.486	Positivo			
8 semanas	0.595	Positivo			
8 semanas	0.119	Negativo			
9 semanas	1.038	Positivo			
9 semanas	1.035	Positivo			
9 semanas	0.731	Positivo			
10 semanas	0.623	Positivo			

CUADRO No. 3

Total de cerdos muestreados por edad en semanas en la Granja A y B

	Positivo	Negativo	Sospechoso	Total
1 semana	6	0	0	6
2 semanas	6	0	0	6
3 semanas	6	0	0	6
4 semanas	6	0	0	6
5 semanas	4	2	0	6
6 semanas	3	3	0	6
7 semanas	3	3	0	6
8 semanas	2	4	0	6
9 semanas	4	2	0	6
10 semanas	3	3	0	6
12 semanas	3	3	0	6
14 semanas	3	2	1	6
16 semanas	5	1	0	6
18 semanas	5	1	0	6
Total	59	24	1	84

CUADRO No. 4

Resultados en porcentaje de muestras serológicas de cerdos positivos y negativos a la prueba de ELISA de la Granja A y Granja B por semanas de edad.

	Positivo	Negativo
1 semana	100%	0%
2 semanas	100%	0%
3 semanas	100%	0%
4 semanas	100%	0%
5 semanas	66.67%	33.33%
6 semanas	50%	50%
7 semanas	50%	50%
8 semanas	33.33%	66.67%
9 semanas	66.67%	33.33%
10 semanas	50%	50%
12 semanas	50%	50%
14 semanas	50%	33.33%
16 semanas	83.33%	16.67%
18 semanas	83.33%	16.67%

CUADRO No. 5

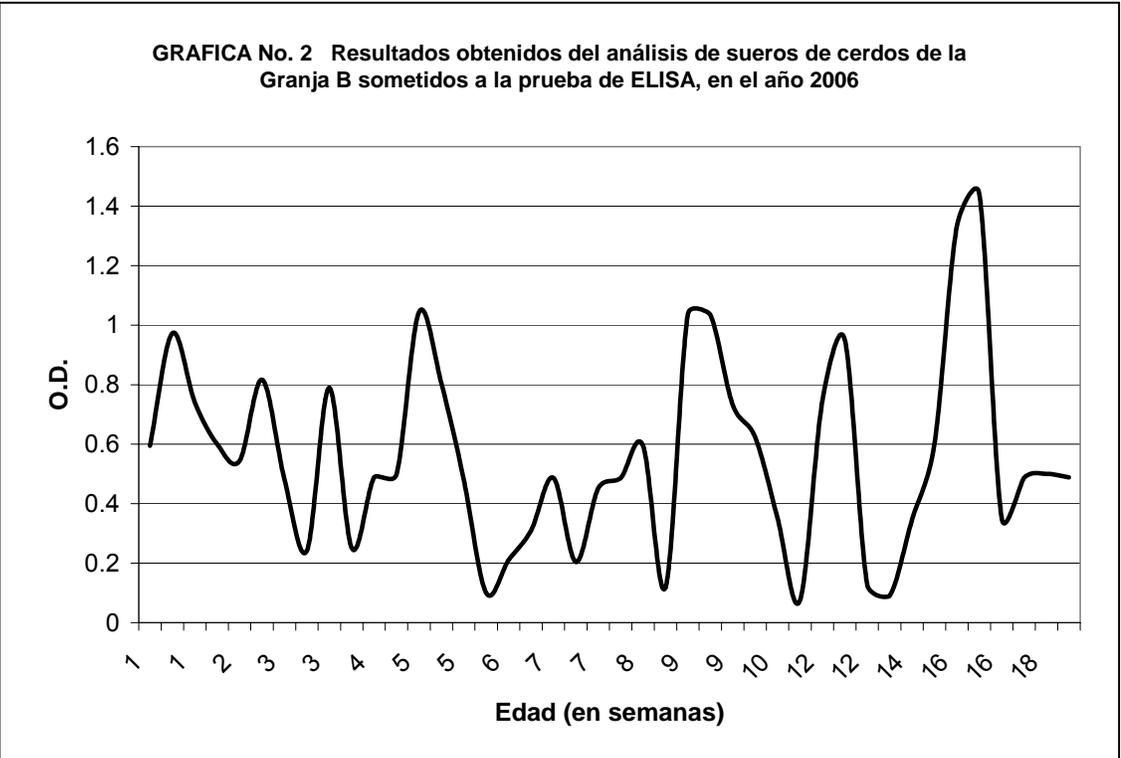
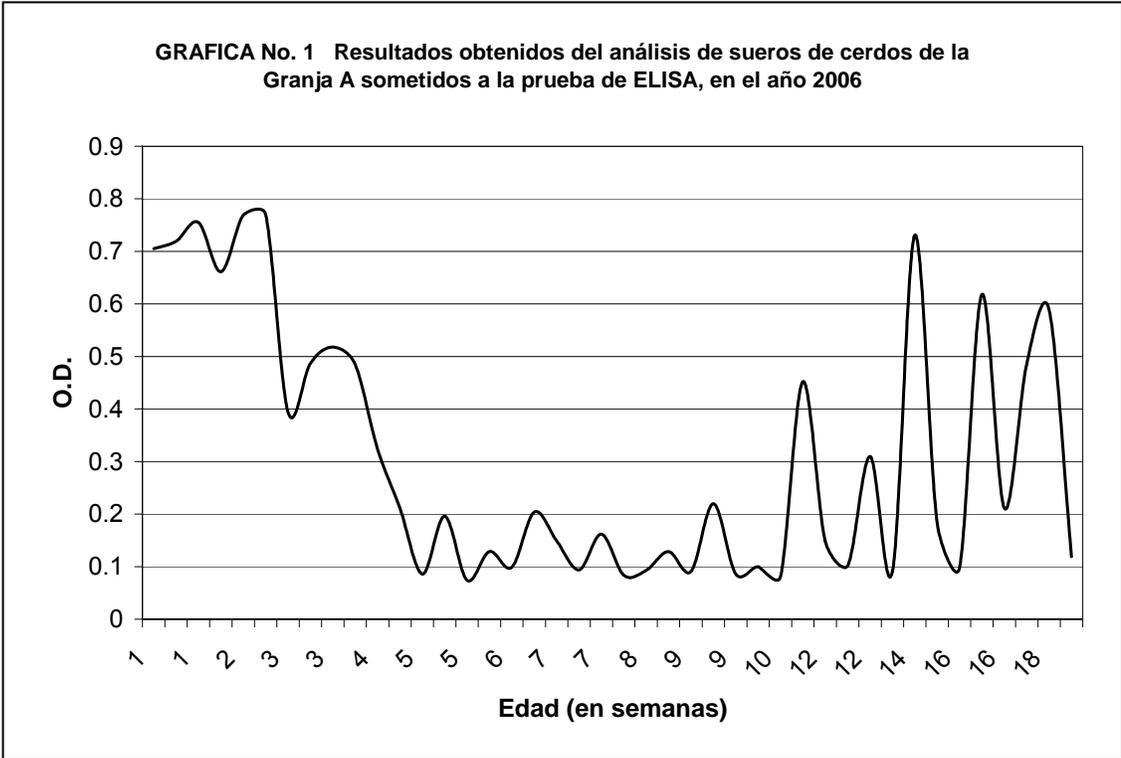
Resultados obtenidos de cerdos positivos y negativos a la prueba serológica de ELISA por granja, en el año 2006

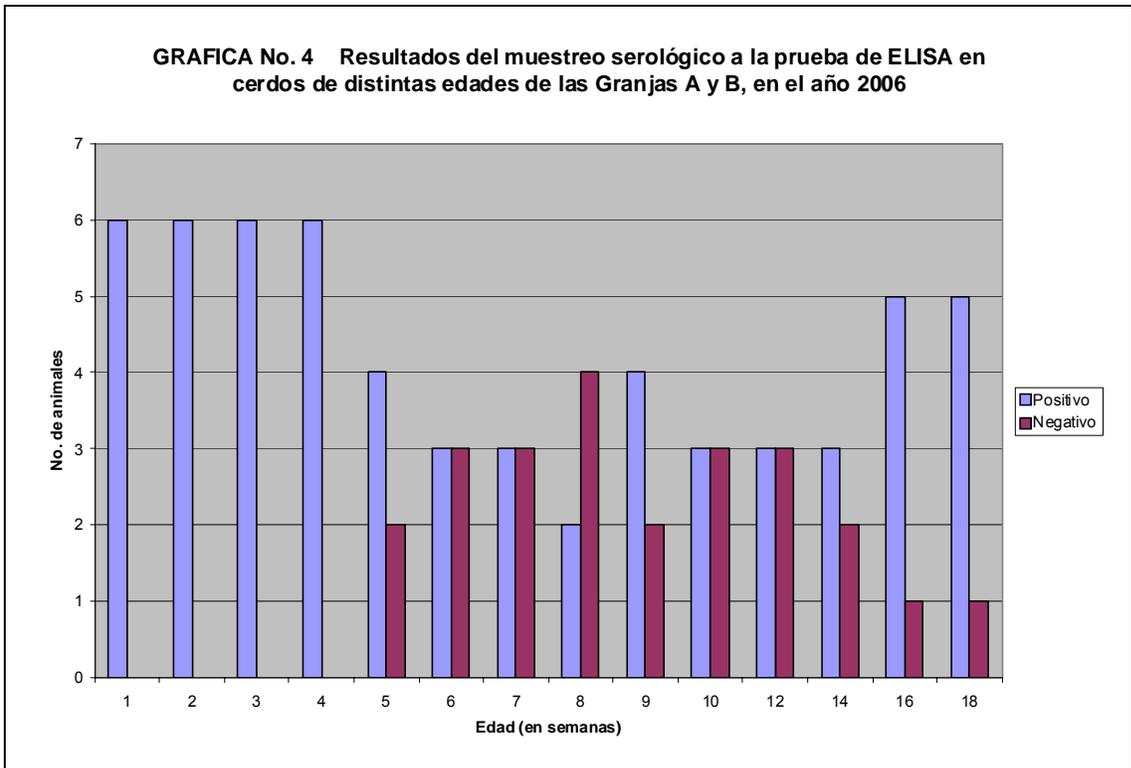
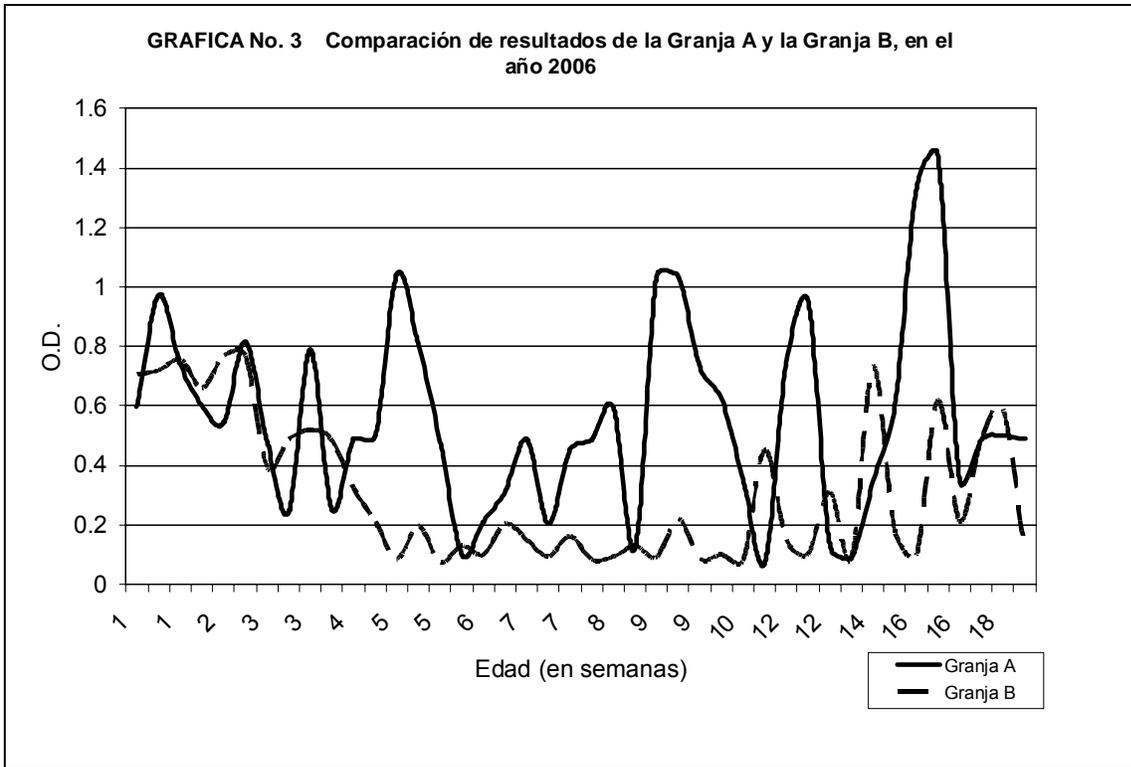
	Positivo	Negativo	Total
Granja A	22	19	41
Granja B	37	5	42
Total	59	24	83

CUADRO No.6

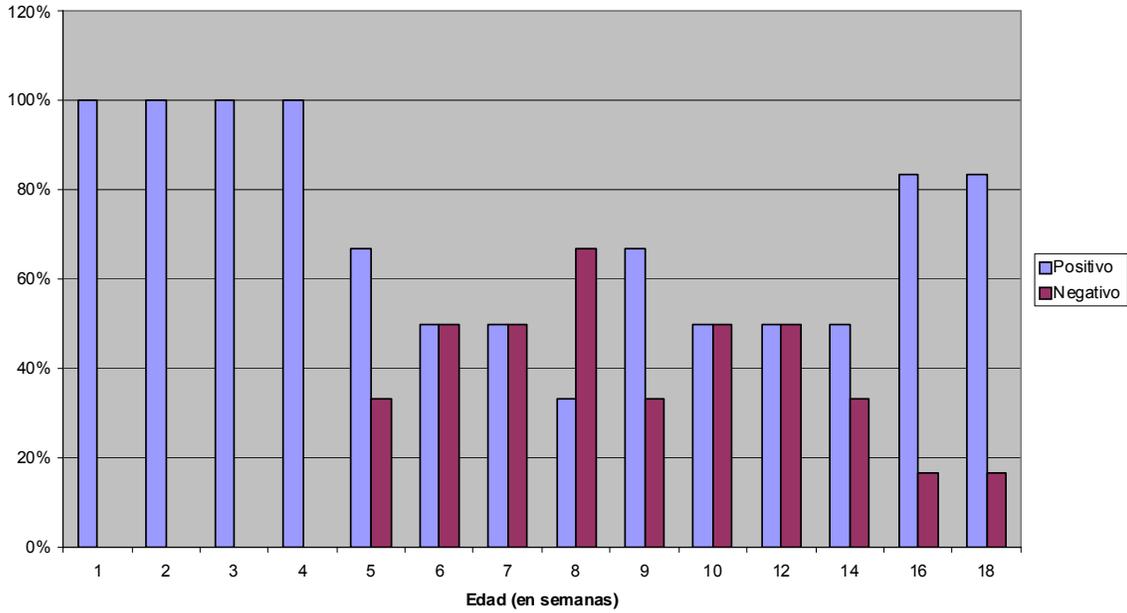
Resultados obtenidos, en porcentaje, de cerdos positivos y negativos a la prueba serológica de ELISA por granja, en el año 2006

	% Positivo	% Negativo	Total
Granja A	53%	46%	100%
Granja B	88%	12%	100%





GRAFICA No. 5 Resultados (en porcentaje) del muestreo serológico a la prueba de ELISA en cerdos de distintas edades de las Granjas A y B, en el año 2006



GRAFICA No. 6 Resultados obtenidos de cerdos positivos y negativos a la prueba serológica de ELISA por granja, en el año 2006

