

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



**COMPARACIÓN DE 3 TÉCNICAS DE TOMA DE MUESTRA PARA
DETECCIÓN DE *Mycoplasma hyopneumoniae* A TRAVÉS DE LA
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN CERDAS
REPRODUCTORAS DE UNA GRANJA TECNIFICADA, EN EL
DEPARTAMENTO DE SACATEPÉQUEZ**

MARIAN ELIZABETH MOLINA RECINOS

MÉDICA VETERINARIA

GUATEMALA, OCTUBRE DE 2019

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



**COMPARACIÓN DE 3 TÉCNICAS DE TOMA DE MUESTRA PARA
DETECCIÓN DE *Mycoplasma hyopneumoniae* A TRAVÉS DE LA
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN CERDAS
REPRODUCTORAS DE UNA GRANJA TECNIFICADA, EN EL
DEPARTAMENTO DE SACATEPÉQUEZ**

TRABAJO DE GRAUDACIÓN

PRESENTADO A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD

POR

MARIAN ELIZABETH MOLINA RECINOS

Al conferírsele el título profesional de

Médica Veterinaria

En el grado de Licenciado

GUATEMALA, OCTUBRE DE 2019

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

DECANO:	M.A Gustavo Enrique Taracena Gil.
SECRETARIO:	Dr. Hugo René Pérez Noriega
VOCAL I:	M. Sc. Juan José Prem Gonzalez
VOCAL II:	Lic. Zoot. Miguel Ángel Rodenas Argueta
VOCAL III:	Lic. Zoot. Alex Rafael Salazar Melgar
VOCAL IV:	Br. Yasmín Adalí Sian Gamboa
VOCAL V:	Br Maria Fernanda Amézquita Estévez

ASESORES

M.V. ABBY QUETZALÍ LOPEZ DE LEÓN

M.A. YERI EDGARDO VELIZ PORRAS

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

En el cumplimiento con lo establecido por los reglamentos y normas de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración el trabajo de graduación titulado:

COMPARACIÓN DE 3 TÉCNICAS DE TOMA DE MUESTRA PARA DETECCIÓN DE *Mycoplasma hyopneumoniae* A TRAVÉS DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) EN CERDAS REPRODUCTORAS DE UNA GRANJA TECNIFICADA, EN EL DEPARTAMENTO DE SACATEPÉQUEZ

Que fuera aprobado por la Honorable Junta Directiva de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Como requisito previo a optar el título de:

MÉDICA VETERINARIA

ACTO QUE DEDICO A:

A DIOS

Por su amor, misericordia y por permitirme llegar a alcanzar este logro a través de muchas bendiciones que me dio a lo largo de este proceso.

A MIS PADRES

Más que mis padres mi vida, Sonia Recinos de Molina por ser la mejor madre del mundo caracterizada por su grandeza y humildad y a Edwin Molina Castellanos por su apoyo, dedicación y amor, gracias a ambos por alentarme a ser mejor, los amo.

A MIS ABUELITOS

Por sus enseñanzas, consejos y todo su amor, los amo para siempre.

A MIS HERMANOS

Kevin Molina Recinos, Harry Molina Recinos, Antonio Molina Recinos y a Randy Molina por nunca dejarme sola, todos ustedes son mi ejemplo a seguir, gracias por su apoyo.

A MIS TIOS

Por siempre estar en todo momento para mí y desearme lo mejor en cada etapa de mi vida, sobre todo a mis tíos Patricia Molina y Rocael Molina por brindarme su amor y apoyo en todo este tiempo.

A MIS PRIMOS

Por su apoyo.

A MIS CUÑADAS

Por su apoyo.

A MIS AMIGOS

Por alegrarme la vida en toda la carrera, por su apoyo, comprensión y los momentos de felicidad, Sobre todo a Magly Morales, Gaby Carrera, Carolina Escobar, Mafer Cruz y Liliana López.

A MI NOVIO

Por todo su amor, apoyo y comprensión.

AGRADECIMIENTOS

A LA USAC

Por haberme permitido realizar en ella mis estudios y formarme como profesional.

A LA FMVZ

Que siempre la llevare en mi corazón.

A LOS CATEDRÁTICOS

Que compartieron de su conocimiento.

A MIS ASESORES

Dra. Abby Lopéz y al Dr. Yeri Veliz por su paciencia, tiempo, dedicación y por todo su apoyo, GRACIAS.

A LOS DOCTORES

Jaime Méndez y Lucero Serrano que me apoyaron y me brindaron de sus conocimientos.

AL LICENCIADO

Carlos Chinchilla por su tiempo y apoyo que me brindo en todo momento.

A LA FAMILIA

López Velásquez por abrirme las puertas y compartirme de sus conocimientos.

A TODAS

Aquellas personas que de alguna u otra forma me ayudaron a alcanzar esta meta. A TODOS MUCHAS GRACIAS.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. HIPÓTESIS	2
III. OBJETIVOS	3
3.1 General	3
3.2 Específicos	3
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	4
4.1 Neumonía enzoótica porcina	4
4.2 Etiología	4
4.3 Importancia de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	5
4.4 Epidemiología	5
4.5 Patogénesis	6
4.6 ¿Cómo es el mecanismo de defensa pulmonar?.....	8
4.7 Inmunidad	9
4.8 Signos clínicos	10
4.9 Lesiones	11
4.9.1 Lesiones macroscópicas	11
4.9.2 Lesiones microscópicas.....	12
4.10 Diagnóstico	12
4.10.1 Signos clínicos.....	12
4.10.2 Lesiones	13
4.10.3 Demostración de infecciones por <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	13
4.10.4 Cultivo bacteriológico del tejido pulmonar	13
4.10.5 Pruebas serológicas	13
4.11 Diagnóstico diferencial	14
4.12 Tratamiento.....	15
4.12.1 Medicación	15
4.13 Prevención.....	15
4.13.1 Esquemas de erradicación	16

4.13.2 Vacunación.....	16
4.14 Prueba de PCR (La reacción en cadena de la polimerasa)	18
4.15 Función del PCR.....	18
4.15.1 Desnaturalización	19
4.15.2 Hibridación.....	19
4.15.3 Extensión	19
4.16 Tipos de PCR.....	20
4.16.1 PCR anidada	20
4.16.2 PCR in situ.....	20
4.16.3 PCR múltiple.....	20
4.16.4 RT- PCR	20
4.16.5 PCR cuantitativa (qPCR)	22
4.17 Técnicas de muestreo.....	23
4.17.1 Fluidos orales	23
4.17.2 Hisopado laríngeo.....	24
4.17.3 Hisopado traqueo-bronquial	24
V. MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1 Materiales	25
5.1.1 Recursos humanos.....	25
5.1.2 Recursos de laboratorio.....	25
5.1.3 Recursos de campo.....	25
5.1.4 Recursos biológicos.....	26
5.2 Metodología	27
5.2.1 Diseño de estudio	27
5.2.2 Área de estudio	27
5.2.3 Procedimiento de la técnica de toma de muestra fluidos orales	28
5.2.4 Procedimiento de la técnica de toma de muestra hisopado laríngeo.....	28
5.2.5 Procedimiento de la técnica de toma de muestra hisopado traqueo- bronquial en animales post-mortem	29
5.2.6 Traslado de las muestras al laboratorio.....	29
5.2.7 Procesamiento del análisis de las muestras con RT - PCR.....	30

5.2.8 Técnica de RT – PCR.....	30
5.3 Variable respuesta	30
5.4 Análisis de los resultados	31
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
VII. CONCLUSIONES.....	36
VIII. RECOMENDACIONES	37
IX. RESUMEN	38
SUMMARY	39
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
XI. ANEXOS	42
Anexo 11.1 Fundamento estadístico de la prueba.....	43
Anexo 11.2 Análisis estadístico con la prueba de Chi-cuadrado con bondad de ajuste	44
Anexo 11.3 Tabla no. 2 Resultados del laboratorio de las 3 técnicas de toma de muestra.....	45
Anexo 11.4 Tabla no. 3 Prueba de chi- cuadrado de los resultados obtenidos.	46
Anexo 11.5 Fichas de control de resultados de las 3 técnicas de toma de muestra.....	47
Anexo 11.6 Gráfica de serología de <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> de la granja tecnificada.....	49
Anexo 11.7 Técnica de toma de muestra de fluidos orales	49
Anexo 11.8 Técnica de toma de muestra hisopado laríngeo	50
Anexo 11.9 Examen de los lóbulos pulmonares	51
Anexo 11.10 Muestras recolectadas en tubos vacutainer.....	52
Anexo 11.11 Grados de lesión en el pulmón por <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> .	52

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1

Resultados de las 3 técnicas a través de RT-PCR32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1

Resultados positivos y negativos de las tres técnicas de toma de muestra32

I. INTRODUCCIÓN

La porcicultura en Guatemala es considerada como la segunda actividad pecuaria de mayor importancia, ya que se encarga de la crianza, alimentación y comercialización de los cerdos, según la FAO Guatemala posee la mayor producción porcina en comparación con el resto del istmo centroamericano (Calderon, 2015).

La porcicultura en Guatemala ha tenido un crecimiento acelerado desde 1990 con 500,000 cerdos a 1,125,844 para el año 2008. De acuerdo con lo indicado por APOGUA, la producción porcícola genera 10,000 empleos directos, 60,000 indirectos y aproximadamente medio millón de beneficiados; contribuye con el 1.7% del Producto Interno Bruto y con el 14.2% del Producto Interno Bruto Agropecuario. Sólo en el comercio nacional de carne de cerdo se generan más de 100 millones de dólares (Chavez, 2012).

Hoy en día se han presentado diferentes enfermedades en las piaras porcinas, lo cual es el caso de la neumonía enzoótica porcina, estudios han mostrado que la mayoría de las piaras porcinas se encuentran infectadas por esta enfermedad, la cual es causada por la bacteria *Mycoplasma hyopenumoniae*, haciendo de esta una de las enfermedades porcinas más prevalentes y costosas (Maes, 1996; C. Fablet, 2010).

La neumonía enzoótica porcina se caracteriza por afectar la ganancia diaria de peso (GDP) y la eficiencia de conversión, pudiendo retardar la fecha de faena en más de 5 días o produciendo pérdidas en la ganancia de peso mayor a los 20 gr por día (Carranza, 2006).

En el presente estudio se compararán 3 diferentes técnicas de toma de muestras en cerdas reproductoras (fluidos orales, hisopado laríngeo e hisopado en tráquea y bronquios en animales post-mortem) a través de la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para el diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae*, con el objetivo de determinar cuál de las 3 técnicas es más confiable.

II. HIPÓTESIS

Las tres técnicas de toma de muestra son confiables para la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdas reproductoras.

III. OBJETIVOS

3.1 General

Contribuir al estudio del diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae* en animales vivos y post-mortem utilizando diferentes técnicas de toma de muestra.

3.2 Específicos

Determinar cuál de las 3 técnicas de toma de muestra es la más efectiva para la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae* a través de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR).

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Neumonía enzoótica porcina

La neumonía enzoótica porcina se caracteriza por ser una enfermedad crónica del aparato respiratorio de los cerdos, se manifiesta por tos persistente en las piaras afectadas. Esta enfermedad es provocada por el patógeno *Mycoplasma hyopneumoniae*, patógeno bacteriano considerado de mayor importancia económica en la porcicultura, ya que produce grandes pérdidas económicas. *M. 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 (Hegel, 2010).

La neumonía enzoótica porcina también es conocida como: Neumonía Micoplasmica o Micoplasmatica (Hegel, 2010).

Enfermedad que presenta baja mortalidad, pero alta morbilidad, por lo que produce un gran impacto en los parámetros productivos en los cerdos de engorde, disminuyendo la ganancia de peso media diaria y la eficiencia de la conversión alimenticia (Hegel, 2010).

Se encuentra asociada con otros patógenos respiratorios de los porcinos, entre ellos: *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis* y *Bordetella bronchiseptica*. Todos ellos incrementan la severidad de la infección.

4.2 Etiología

Mycoplasma hyopneumoniae es el agente principal de la Neumonía enzoótica porcina. La bacteria se caracteriza por ser pequeña, pleomórfica, filtrable y difícil de aislar por lo exigente en requisitos de crecimiento y la presencia frecuente de *Mycoplasma hyorhinis*, infecta únicamente a los cerdos (Hegel, 2010; Torres, 2003).

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 por qué existe resistencia a los

antibióticos beta-lactámicos, ya que estos interfieren con el metabolismo de la pared (Hegel, 2010; Maes, 1996).

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 (Hegel, 2010).

4.3 Importancia de *Mycoplasma hyopneumoniae*

- Bacteria que provoca una alteración a nivel pulmonar, lesionando gravemente el aparato mucociliar del cerdo, predisponiéndole a enfermedades bacterianas y víricas.
- Capaz de escapar del sistema inmune, produciendo una fuerte reacción a nivel pulmonar generando el acumulo de células inflamatorias, provocando las lesiones características.
- Potencia infecciones víricas como bacterianas, modificando la respuesta inmune frente a otros patógenos (Lobo, 2005).

4.4 Epidemiología

La transmisión de *Mycoplasma hyopneumoniae* se da por contacto directo de un cerdo infectado a un cerdo susceptible, a través de las secreciones del aparato respiratorio del cerdo infectado (Hegel, 2010; Fano, 2007).

Los lechones pueden ser infectados por la madre poco tiempo después del nacimiento o al momento del destete cuando son mezclados con otros cerdos. Los lechones pueden infectarse más por primerizas o por cerdas de baja paridad, debido a que estas presentan una inmunidad menor y excretan más microorganismos que otras cerdas (Hegel, 2010; Maes, 1996; Torres, 2003).

Los cerdos portadores son responsables de las infecciones persistentes. La infección intrauterina o la transmisión a través de la leche no tiene lugar en esta enfermedad (Hegel, 2010; Maes, 1996; Sacristan, 2014).

Se ha determinado tres mecanismos por los cuales la infección por *Mycoplasma hyopneumoniae* se mantiene en una granja: transmisión de madres infectadas a sus lechones, cerdos infectados mezclados con cerdos susceptibles, el ingreso de cerdos a las instalaciones (Lobo, 2005).

En los sistemas de producción continua, *Mycoplasma 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 (Hegel, 2010; Maes, 1996; Torres, 2003).

Las pérdidas económicas asociadas con *Mycoplasma hyopneumoniae* son el resultado de la interacción entre infecciones bacterianas y *Mycoplasma hyopneumoniae*, deficiencias en el manejo y condiciones ambientales adversas. Entre los factores ambientales se pueden mencionar la densidad, alimentación, concentración de amoníaco, ventilación, volumen de aire, temperatura y condiciones de las instalaciones (Hegel, 2010; Maes, 1996).

La mortalidad se da por infecciones secundarias debido a una inmunosupresión provocada por *Mycoplasma hyopneumoniae*. Las infecciones secundarias son ocasionadas por los siguientes patógenos: *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Bordetella bronchiseptica* y *Actinomyces pyogenes* (Hegel, 2010; Maes, 1996).

4.5 Patogénesis

El periodo de incubación normalmente es de 10-16 días. La inhalación del patógeno dependerá de los factores de riesgo, ya que *Mycoplasma hyopneumoniae* está presente en la mayoría de las explotaciones. La adhesión al epitelio ciliado de la tráquea, los bronquiolos es un requisito previo para el inicio de la enfermedad (Hegel, 2010; Maes, 1996; Sacristan, 2014).

El *Mycoplasma 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 efecto de la colonización se produce un aglutinamiento, ocasionando la pérdida de los cilios y una excesiva producción de moco por la parte de las células, provocando una disfunción del aparato mucociliar y reducción de la eliminación pulmonar de las partículas inhaladas (Hegel, 2010).

Las infecciones por *Mycoplasma hyopneumoniae* pueden dar como resultado una respuesta inmune humoral suprimida, porque los linfocitos tienen una capacidad reducida para producir anticuerpos. La inmunidad celular se suprime mediante la inhibición de la fagocitosis mediada por macrófagos. Estos efectos supresores son más pronunciados en el periodo posterior a la infección, pero esta supresión puede continuar varias semanas después de la infección inicial. El epitelio dañado, la presencia de moco espeso y viscoso y la inmunidad suprimida, son los principales factores subyacentes a las infecciones secundarias comunes. Con frecuencia la infección posterior con *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) y *Actinobacillus pleuroneumoniae* (*A. pleuroneumoniae*) pero también otras bacterias formadoras de pus, tales como *Actinomyces pyogenes*, *estreptococos*, *estafilococos* (Maes, 1996).

La transmisión de *Mycoplasma hyopneumoniae* se da principalmente por contacto directo con secreciones respiratorias de cerdos portadores. La eliminación de *Mycoplasma 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 en crecimiento y finalización (Hegel, 2010; Sacristan, 2014).

Lo ideal es poner en práctica el sistema "todo dentro, todo fuera", sistema que implica el vaciado completo de una sala, nave o corral, para su posterior limpieza y desinfección, dejando un tiempo de reposo (sin animales) antes de introducir un nuevo lote, esto con el fin de evitar que animales de distintas edades

entren en contacto, con el objetivo de cortar ciclos de infección de organismos patógenos al impedir que los animales de más edad infecten a los de reciente ingreso, esto reducirá la transmisión de microorganismos de las maternidades, combinado con una edad de destete máxima de 20 días disminuirá la transmisión de la hembra al lechón, en el destete y en el engorde también disminuirá la transmisión de cerdo a cerdo al no permitir el contacto con cerdos mayores infectados (Hegel, 2010).

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 nematodos (Hegel, 2010).

4.6 ¿Cómo es el mecanismo de defensa pulmonar?

El sistema de defensa del pulmón representa la primera barrera en la remoción mecánica de las partículas inhaladas. El aparato respiratorio tiene la capacidad de eliminar todas las partículas inhaladas, excepto aquellas de menor tamaño, lo cual lo realiza mediante barreras mecánicas, tales como: el moco y vellos en la nariz, el epitelio ciliado, el moco en tráquea y bronquios y los cambios bruscos de dirección del árbol respiratorio, que favorece el depósito de partículas. Las partículas acumuladas en diferentes áreas, son removidas rápidamente por el flujo del moco, esto dependerá fundamentalmente del tamaño de estas. Así, las partículas de más de 10 micras se depositan en los cornetes nasales por su fuerza

de inercia. Estas partículas bajan para el árbol respiratorio, lo cual hace que la velocidad del flujo de aire descienda, ocasionando la sedimentación por gravedad de partículas de 10-2 micras en el epitelio traqueo-bronquial. Las partículas de menos de 0.5 micras no se acumulan y por tanto salen con la expiración (Pijoan).

Las partículas que no se depositan, tal es el caso de las partículas con diámetro entre 0.5-2 micras, logran llegar a la pared alveolar.

La diferencia en la eficiencia para eliminar las partículas entre el epitelio traqueo bronquial y el alveolo es marcada: mientras que el epitelio ciliado logra retirar el 90% de partículas depositadas en menos de una hora, el alveolo solo puede retirar el 50% en cuestión de horas, mientras que el resto puede tardar meses o incluso no ser retirado (Pijoan).

La mayor parte de bacterias y micoplasmas están comprendidas entre las 0.5-2 micras, por lo que el pulmón debe contar con otros mecanismos de defensa a nivel alveolar. Entre estos tenemos el macrófago alveolar, el cual es el principal responsable en la inactivación de las bacterias. Este macrófago es muy eficiente como bactericida, ya que contiene niveles altos de lisozima, la cual impide infecciones y se encuentra presente en numerosas sustancias segregadas. El macrófago también contiene cantidades considerables de inmunoglobulinas (Pijoan).

4.7 Inmunidad

Mycoplasma hyopneumoniae es un organismo no invasivo, por lo que la inmunidad activa se adquiere lentamente. Estudios han descrito que los cerdos infectados presentan una marcada respuesta de anticuerpos. Sin embargo, la correlación entre la protección y el título de anticuerpos es mínima. La inmunidad natural inducida es poderosa y duradera. Esto explica porque los cerdos que están expuestos regularmente al organismo no muestran signos clínicos, incluso si viven entre una población crónicamente infectada.

La protección se basa principalmente en la inmunidad mediada por células y la secreción local de Ig A (Maes, 1996; Torres, 2003).

El periodo en que se detectan anticuerpos maternos varia con el método serológico utilizado, porque diferentes métodos tienen diferentes umbrales de detección de anticuerpos. La persistencia de anticuerpos adquiridos pasivamente también está relacionada con la concentración inicial de anticuerpos en el lechón. Este último se correlaciona con el estado serológico de la cerda. Para lechones con una concentración inicial de anticuerpos clasificada como baja, media o alta, los anticuerpos disminuyen a los 30, 45 y 63 días, respectivamente. Sin embargo, no existe una relación perfecta entre los títulos de la cerda y del lechón recién nacido. Varios factores externos, como el comportamiento de los lactantes, la competencia entre compañeros de camadas, la producción de leche y el comportamiento de la madre, tienen una influencia importante en la ingesta del calostro. Suponiendo una desintegración relativamente constante de anticuerpos de la misma clase, las estimaciones de anticuerpos permiten realizar comparaciones más apropiadas entre estudios similares. La vida media de los anticuerpos contra *Mycoplasma hyopneumoniae* derivados de la madre es de 15 – 16 días (Maes, 1996; Torres, 2003).

4.8 Signos clínicos

Los cerdos de todas las edades son susceptibles a las infecciones por *Mycoplasma hyopneumoniae*. El principal signo es la tos, apareciendo lentamente, hasta alcanzar su punto máximo 4 semanas después de la infección inicial, pudiendo durar 8 semanas, dependiendo del estado inmunológico del cerdo y del manejo en las granjas. Algunas veces la intensidad de la tos puede ser mayor en cerdos en la etapa de crecimiento y desarrollo. Los cerdos pueden llegar a morir entre 4 y 6 meses de edad, debido a infecciones bacterianas secundarias y estrés. En cuanto al sexo, existe mayor prevalencia de neumonía y pleuritis en machos castrados comparado con hembras (debida al estrés y cambios hormonales) (Hegel, 2010; Maes, 1996; Torres, 2003).

Cuando la infección por *Mycoplasma hyopneumoniae* no se complica con infecciones secundarias, la enfermedad puede tomar un curso subclínico, desarrollando una tos seca no productiva, fiebre y anorexia leves. En el caso contrario, en que la enfermedad se complique con infecciones secundarias, toma un curso clínico, presentando tos productiva, fiebre alta, anorexia, dificultad para respirar y postración. Por lo tanto, los cerdos muestran un severo retraso en el crecimiento, una eficiencia de alimentación reducida y pelo hirsuto (Hegel, 2010; Sacristan, 2014).

4.9 Lesiones

4.9.1 Lesiones macroscópicas

Si la enfermedad se encuentra en la etapa inicial o media, se presenta una neumonía catarral ubicada en las porciones ventrales de los lóbulos craneal y medial, en el lóbulo accesorio y en la porción craneal de los lóbulos caudales del pulmón. Con frecuencia los nódulos linfáticos bronquiales y los nódulos mediastínicos se muestran inflamados, Por lo tanto, en la etapa crónica de la enfermedad, se presentan áreas de consolidación purpura a gris, localizadas en las partes antero-ventrales del pulmón (Hegel, 2010; Maes, 1996; Sacristan, 2014).

No existen lesiones patognomónicas (Hegel, 2010; Maes, 1996; Sacristan, 2014).

La lesión en el pulmón varía de acuerdo a la gravedad de la enfermedad, en el caso de lesiones agudas, las partes afectadas de los pulmones se encuentran edematosas, con coloración gris pálido y pobremente demarcadas por tejido pulmonar normal. Cuando las lesiones son subagudas, las lesiones se observan de color púrpura oscuro, presenta atelectasia y están claramente demarcadas de tejido pulmonar adyacente. Cuando las lesiones son crónicas, se observan fisuras estrechas ramificadas compuestas por porciones atelectásicas del pulmón (Hegel, 2010; Maes, 1996; Sacristan, 2014).

Las lesiones de neumonía pueden recuperarse después de 7-10 semanas, y en ese momento, las retracciones de cicatriz interlobulares rojo a violáceo del tejido conectivo, llamadas fisuras, están presentes (lesiones antiguas) (Hegel, 2010; Maes, 1996; Sacristan, 2014).

Las infecciones por *Mycoplasma hyopneumoniae* se complican por patógenos bacterianos secundarios, las lesiones de neumonía ocupan una gran superficie del pulmón y se caracterizan por la presencia de exudado mucopurulento en las vías respiratorias, una consistencia más firme y un color grisáceo incoherente en el parénquima pulmonar (Hegel, 2010; Maes, 1996; Sacristan, 2014).

4.9.2 Lesiones microscópicas

Las lesiones se pueden observar mayormente en las vías respiratorias, produciendo una pérdida de cilios, exfoliación de células ciliadas y pequeñas acumulaciones de neutrófilos en la luz y alrededor de las vías respiratorias. A medida que va avanzando la infección, se puede encontrar un mayor número de linfocitos ubicados en los espacios peribronquial, peribronquiolar, perivascular. La acumulación linfocitaria se puede puntuar mediante el método descrito por Morris, a través del uso de microscopia óptica, la cual varía de 1 (donde la acumulación linfocitaria está limitada alrededor de los bronquiolos) a 5 (acumulación severa de células linfocíticas alrededor de los bronquiolos e intersticio y exudados celulares inflamatorios en las vías respiratorias) (Hegel, 2010; Maes, 1996; Sacristan, 2014).

4.10 Diagnóstico

Un diagnóstico adecuado, comprende la combinación de la evaluación clínica, presencia de las lesiones macro y microscópicas y pruebas de laboratorio (Maes, 1996; Torres, 2003).

4.10.1 Signos clínicos

Presencia de tos no productiva, acompañada con una baja ganancia de peso y eficiencia de conversión, baja mortalidad.

Hay métodos que se utilizan para evaluar la gravedad de la tos, en el caso de este método fue descrito por Halbur y col. (1996) consiste en cuantificar la gravedad, en donde puede variar de 0 a 6: 0 (sin tos), 1 (tos leve después de un movimiento alentado), 2 (tos leve en reposo), 3 (tos moderada después de un movimiento alentado), 4 (tos moderada en reposo), 5 (tos severa después de un movimiento alentado), 6 (tos severa en reposo) (Hegel, 2010; Sacristan, 2014).

4.10.2 Lesiones

El examen macroscópico es un excelente método para controlar la salud respiratoria. Los hallazgos microscópicos de la acumulación linfocítica peribronquiolar y perivascular y la formación de nódulos no son específicos de las infecciones por *Mycoplasma hyopneumoniae*, pero pueden ser útiles para un diagnóstico final (Hegel, 2010; Sacristan, 2014).

4.10.3 Demostración de infecciones por *Mycoplasma hyopneumoniae*

4.10.4 Cultivo bacteriológico del tejido pulmonar

Se considera un método óptimo para el diagnóstico de neumonía enzoótica, sin embargo, debido al crecimiento exigente de *Mycoplasma hyopneumoniae*, el procedimiento de aislamiento requiere de mucho tiempo, ya que se necesita de medios especiales y el organismo crece lentamente, con frecuencia está cubierto con *Mycoplasma hyorhinis*, un invasor secundario común en la neumonía porcina, por lo que no se toma como un método rutinario para el diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae* (Sacristan, 2014).

4.10.5 Pruebas serológicas

Estas pruebas están basadas en la reacción antígeno-anticuerpo, y se constituye una de las herramientas más factible para el diagnóstico y manejo de la enfermedad. A través de estas pruebas se puede mostrar la presencia del antígeno de *Mycoplasma hyopneumoniae* en las vías respiratorias, siendo este antígeno más abundante en las lesiones agudas (Hegel, 2010).

Entre las pruebas serológicas para detección de *Mycoplasma hyopneumoniae* se encuentran:

- ELISA (Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas)
- Inmunofluorescencia indirecta
- Hemaglutinación indirecta
- Anticuerpos fluorescentes
- Fijación de complemento
- Aglutinación en látex
- Inmunohistoquímica (Hegel, 2010).

Prueba molecular para detección de *Mycoplasma hyopneumoniae*

- PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)

4.11 Diagnóstico diferencial

Cualquier enfermedad relacionada con problemas respiratorios debe diferenciarse de neumonía enzoótica.

- Una de estas enfermedades es la influenza porcina (H1N1 y H3N2), esta presenta una alta morbilidad. La influenza porcina ocasiona hipertermia, postración, tos y disnea. Sin la presencia de infecciones secundarias, la recuperación es rápida (Hegel, 2010; Maes, 1996).
- La enfermedad de aujeszky, ya que de igual manera se caracteriza por provocar tos, vómitos, parálisis leve, tiene una tasa de mortalidad de 2 a 10%.
- Síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS), otra enfermedad viral causante de problemas respiratorios al estar combinados con agentes secundarios.
- Pleuroneumonía, enfermedad provocada por *Haemophilus pleuropneumoniae*, enfermedad bacteriana con una tasa de mortalidad de 20%

- Enfermedad de glasser, enfermedad bacteriana que está asociada con neumonía en lechones menores de 3 semanas de edad, por lo que es un diagnóstico diferencial de la neumonía enzoótica.
- Entre las bacterias que pueden actuar como agentes secundarios del pulmón están: *Pasteurella multocida tipo A*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *A. pyogenes*.
- En el caso de parásitos, las larvas migratorias de *Asacris suum*, ocasionan daños a nivel del tejido pulmonar, causando problemas respiratorios, por lo que se toma como un diagnóstico diferencial de la neumonía enzoótica (Hegel, 2010; Maes, 1996).

4.12 Tratamiento

4.12.1 Medicación

Varios antibióticos son apropiados para el tratamiento de *Mycoplasma hyopneumoniae*, reduciendo los signos clínicos y la tasa de mortalidad.

Las tetraciclinas, tiamulina, tilosina, espiramicina, lincomicina y las nuevas quinolonas: enrofloxacina, danofloxacina y norfloxacina son eficaces contra *Mycoplasma hyopneumoniae*. Las quinolonas tienen una acción excelente contra agentes mycoplasmáticos (Maes, 1996; Sacristan, 2014).

Mycoplasma hyopneumoniae presenta una resistencia a los antibióticos como penicilina, ampicilina, amoxicilina y cefalosporina, polomixina, oleandomicina, eritromicina, estreptomina, trimetoprim y sulfamidas. Esto es debido a que estos antibióticos tienen acción contra la pared de las bacterias, lo cual *Mycoplasma* es resistente debido a la ausencia de pared (Maes, 1996; Sacristan, 2014).

4.13 Prevención

La prevención de neumonía enzoótica debe de realizarse de diferentes maneras con esquemas de erradicación y vacunación (Maes, 1996).

4.13.1 Esquemas de erradicación

Se recomienda utilizar siguientes medidas:

- El destete temprano medicado, es un sistema basado en la administración de antibióticos a la cerda durante la última gestación e inmediatamente después del parto.
- El destete temprano de los lechones y su cría en sitios aislados previene la transmisión de una variedad de enfermedades de la cerda al lechón, incluyendo *Mycoplasma hyopneumoniae*.
- Higiene parcial, a través de la eliminación de todos los cerdos jóvenes, junto con antibióticos orales durante 2 semanas para las cerdas más viejas. Esto elimina *Mycoplasma hyopneumoniae* de las manadas infectadas (Maes, 1996).

4.13.2 Vacunación

Se encuentran vacunas que consisten en células completas inactivadas con un adyuvante. La vacunación va depender de la edad de los cerdos, se puede vacunar a las cerdas para permitir la protección pasiva en los lechones, o vacunar directamente a los lechones para inducir inmunidad activa, este manejo no interfiere con los anticuerpos maternos derivados del calostro. Se aplica la vacuna dos veces con un intervalo de 3 semanas, para obtener mejores resultados (Sacristan, 2014).

4.13.2.1 Vacunas comerciales

Desarrolladas con bacterinas comerciales, muy efectivas para el control de *Mycoplasma hyopneumoniae*. Las bacterinas comerciales consisten en preparaciones de células completas adyuvadas inactivadas, se ha indicado ser eficaz para controlar la enfermedad (Sacristan, 2014).

Ha podido ser beneficiosa en cuanto a la disminución de las pérdidas causada por el bajo rendimiento, la baja eficiencia alimentaria y la mortalidad,

relacionado con la disminución de los signos clínicos, lesiones pulmonares y costo de medicamentos. A pesar de los grandes beneficios de las bacterinas, también presentan limitaciones como la colonización del tracto respiratorio de *Mycoplasma hyopneumoniae*, proporcionando solo protección parcial (Sacristan, 2014).

Antes de implementar una vacunación es importante que se tomen en cuenta no solamente parámetros de eficacia, sino que también costo – beneficio como:

- El sistema de producción
- El patrón de infección
- El estado de salud de la población
- El tipo de población (Sacristan, 2014).

Como se mencionó anteriormente, el momento óptimo de vacunación para prevenir *Mycoplasma hyopneumoniae* es la vacunación de los lechones antes o al destete y la vacunación de las cerdas, ya que con esto se asegura la inmunización de los lechones recién nacidos a través del paso de los anticuerpos de la madre a través del calostro. Esto no garantiza la prevención de colonización *Mycoplasma hyopneumoniae* en los lechones, ya que el objetivo principal de que se vacunen a las cerdas es disminuir la transmisión vertical (Sacristan, 2014).

La vacunación de los lechones lactantes se realiza a las 3-4 semanas de edad, debido a que *Mycoplasma hyopneumoniae* tiene lugar en los lechones durante la primera semana de vida y es preferible que la vacunación se realice antes de la exposición al patógeno (Sacristan, 2014).

Estudios indicaron que la vacunación temprana en los lechones lactantes con presencia de anticuerpos maternos no interfiere con la eficacia de la vacuna (Sacristán, 2014).

Las vacunas pueden variar dependiendo del tipo de adyuvante, el cual puede ser acuoso (basada en agua como hidróxido de aluminio o carbopol) u oleoso (aceitoso, como aceite mineral o aceite biodegradable), la diferencia de ambas

radica en que las vacunas con adyuvante a base de agua provocan menor estimulación al sistema inmune y como consecuencia se requiere de una nueva vacunación. En cuanto a los adyuvantes a base de aceite son más reactivos y necesitan menor tiempo para procesarse, proporcionando una liberación prolongada del antígeno y una mejor estimulación del sistema inmune (Sacristan, 2014).

4.14 Prueba de PCR (La reacción en cadena de la polimerasa)

PCR es una prueba rápida que consiste en la amplificación in vitro de secuencias de ADN específicas dentro de una muestra. Está diseñada para la amplificación selectiva de una o varias secuencias diana de ADN presente en una mezcla compleja de secuencias (De Dios, 2013; UNED, 2000).

Para que las amplificaciones se lleven a cabo, es necesario disponer de un mínimo de información sobre la secuencia a amplificar. Esta información permite la construcción de 2 oligonucleótidos específicamente de 15 a 30 nucleótidos de longitud que actúan como cebadores (iniciadores) (De Dios, 2013; UNED, 2000).

La PCR es una reacción en cadena porque las hebras de ADN de nueva síntesis sirven a su vez de molde para reacciones de síntesis en ciclos posteriores. Tras unos 30 ciclos, la PCR habrá generado aproximadamente un millón de copias de secuencias diana específica (De Dios, 2013; UNED, 2000).

Las ventajas de PCR para detección de *Mycoplasma hyopneumoniae* consiste en que es una prueba rápida en comparación con el cultivo de células, esta prueba no interfiere con los tratamientos con antibióticos y no hay reacciones cruzadas con organismos coinfectantes (Maes, 1996).

4.15 Función del PCR

Cada ciclo de la PCR se lleva a cabo en tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión.

4.15.1 Desnaturalización

En esta etapa, las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95°C durante 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T. Además, depende la velocidad en la que el termociclador aumenta la temperatura, esto varía de acuerdo al modelo del equipo. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas que servirán como templado para el siguiente paso (De Dios, 2013; UNED, 2000).

4.15.2 Hibridación

En esta etapa, los primers se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado-primers, es importante que la temperatura de hibridación o temperatura melting TM sea la óptima; esta generalmente oscila entre 50-60°C. Si el diseño de los primers es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente (De Dios, 2013; UNED, 2000).

4.15.3 Extensión

En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72°C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (Pb) que deberá ser conocido por el investigador (De Dios, 2013; UNED, 2000).

Al final de la PCR, para saber si la reacción transcurrió eficientemente, los amplicones son visualizados a través de una electroforesis en geles de agarosa. La electroforesis consiste en la separación de grandes moléculas como los ácidos nucleicos a través de una matriz sólida que funciona como un filtro para separar las

moléculas en un campo eléctrico de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica (De Dios, 2013; UNED, 2000).

4.16 Tipos de PCR

4.16.1 PCR anidada

Es una técnica muy sensible, en donde el producto de una amplificación es utilizado como molde para una segunda amplificación con cebadores (primers, iniciadores) que se localizan en la primera secuencia amplificada, es decir, cuando se tiene el primer amplicón inicial. Este tipo de PCR presenta alta sensibilidad y especificidad. Sin embargo, es una técnica que no permite cuantificar una muestra (Neyoy, 2014).

4.16.2 PCR in situ

Esta técnica consiste en una reacción de PCR en secciones histológicas o células, en donde los productos generados se visualizan en el sitio de amplificación. Se realiza sobre preparaciones fijas en un portaobjetos. Esta técnica tiene un gran alcance en cuanto a la capacidad para amplificar una población de secuencias de menor representación (Neyoy, 2014).

4.16.3 PCR múltiple

En esta técnica se amplifica más de una secuencia. Se realiza combinando 2 o más pares de cebadores (Primers, iniciadores) en un mismo tubo, junto con el resto de reactivos en cantidades suficientes para amplificar simultáneamente varios segmentos de ADN. Esta técnica brinda información de varios locus en una sola reacción, por lo que constituye menor cantidad de molde para el análisis, menor cantidad de reactivos, rápida construcción de base de datos. Sin embargo, es una técnica que requiere de una cuidadosa optimización del proceso (Neyoy, 2014).

4.16.4 RT- PCR

Dado que el ARN usualmente es de una sola hebra y es sensible al calor, es necesario hacer una transcripción reversa (RT) antes de iniciar la amplificación por PCR. La transcripción reversa genera una copia de la hebra de ARN, pero esta

copia es ADN complementario (ADNc o DNAc en inglés) el cual es estable al calor y puede resistir la metodología PCR.

Los pasos de la RT-PCR son:

1. Transcripción reversa: Unión del primer a la secuencia de ARN objetivo.
2. Transcripción reversa: La polimerasa *rTth* cataliza la extensión del primer mediante la incorporación de nucleótidos complementarios.
3. Fin de transcripción reversa, se obtiene la hebra del ADNc complementario al ARN.
4. PCR.

El ARNm es copiado a ADNc (ADN complementario) por la transcriptasa reversa usando un primer dT (los primers al azar se pueden también utilizar). En PCR en tiempo real, se utiliza generalmente una transcriptasa reversa que tenga una actividad endo H. Esto elimina el mRNA permitiendo que la segunda hebra de ADN sea formada.

El ADNc se desnaturaliza a más de 90°C (~94°C), las dos hebras se separan. A 72°C la polimerasa extiende el DNA desde los primers. Se obtienen 4 cadenas de ADNc.

Después de 30 o 40 ciclos de síntesis de ADNc, los productos de reacción son analizados usualmente por electroforesis en gel de agarosa. El gel se tiñe con bromuro de etidio. Los geles de agarosa para analizar los productos de ADNc de la RT-PCR no nos permiten la cuantificación ya que el bromuro de etidio es muy insensible y cuando una banda es perceptible sobrepasa la etapa logarítmica de amplificación.

El bromuro de etidio es un colorante que se une a la doble cadena de ADN intercalándose entre los pares de bases. Emite luz fluorescente cuando se irradia en la parte UV del espectro. Sin embargo, la fluorescencia no es muy brillante. Otros

colorantes, como el SYBR green, que son mucho más fluorescentes que el bromuro de etidio, se utilizan en el PCR en tiempo real.

4.16.5 PCR cuantitativa (qPCR)

Esta técnica cuantifica la cantidad de ADN o ARN presentes en la muestra original. Permite cuantificar el número de copias de ADN por ml (Sacristan, 2014).

Esta técnica puede dividirse en dos:

- Técnicas basadas en fluorocromos no específicos y
- Técnicas basadas en sondas específicas.

En las técnicas basadas en fluorocromos el ADN, que se ve multiplicada su cantidad con cada ciclo, se une al fluorocromo (generalmente SYBR Green) produciendo fluorescencia que es medida por el termociclador apto para PCR en tiempo real. Permite cuantificar solo una secuencia por reacción, pero tiene la ventaja de utilizar cebadores normales para su realización. Es mucho más económica que la que usa sondas específicas (Neyoy, 2014).

Las técnicas basadas en sondas específicas utilizan una sonda unida a dos fluorocromos que hibrida en la zona intermedia entre el cebador directo (forward) y el inverso (reverse); cuando la sonda está intacta, presenta una transferencia energética de fluorescencia por resonancia (FRET). Dicha FRET no se produce cuando la sonda está dañada y los dos fluorocromos están distantes, producto de la actividad 5'-3' exonucleasa del ADN polimerasa. Esto permite monitorizar el cambio del patrón de fluorescencia y deducir el nivel de amplificación del gen (Neyoy, 2014).

La detección del ADN de *Mycoplasma hyopneumoniae* mediante la prueba de PCR, se utiliza ampliamente en la actualidad para investigar el posible papel de este agente en la enfermedad respiratoria. El nivel exacto de detección de la infección, así como la característica relativamente rápida y económica de este método, han favorecido su establecimiento en laboratorios de diagnóstico de rutina.

Los ensayos de PCR son adecuados para la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae* en una amplia gama de muestras, que incluyen tejido pulmonar, hisopados nasales y traqueobronquiales, así como fluidos orales, fluido de lavado broncoalveolar, raspados mucosales. Se han descrito diferentes ensayos de PCR (Sacristan, 2014).

4.17 Técnicas de muestreo

4.17.1 Fluidos orales

Esta técnica de muestreo es una herramienta efectiva para monitorear la salud de los cerdos. Se utiliza para detectar la presencia de agentes infecciosos o anticuerpos en una población, y para monitorear como circula un agente patógeno y las enfermedades en los cerdos o también para evaluar el cumplimiento de la vacunación.

El fluido oral está presente en la cavidad oral. Es una mezcla de saliva, que es producida por las glándulas salivales. Las muestras de fluido oral se obtienen fácilmente al momento de utilizar una cuerda de algodón, esto permite un proceso de recolección rápida, fácil, no invasivo y barato. A las muestras de fluido oral se le pueden realizar pruebas para determinar la presencia de anticuerpo y/o patógenos, similar a una muestra de sangre. La cuerda de algodón se utiliza tanto de manera individual como en un grupo de cerdos (Rel production).

El procedimiento se debe de realizar por las mañanas, ya que los cerdos están más activos a esas horas. Si los cerdos están desinteresados en las cuerdas, las recolecciones por la tarde pueden llevar más tiempo que los 20-30 minutos estándares. Si los cerdos se rehúsan a acercarse a la cuerda, se pueden entrenar colocando una cuerda dentro del corral para que jueguen o agregándole un saborizante con soluciones de azúcar para que se vayan acostumbrando. Los cerdos, luego de forma más agresiva, morderán la cuerda para las muestras diagnósticas en el futuro. Estas cuerdas de entrenamiento deben de ser descartadas. Es importante no recoger muestras diagnósticas de cuerdas que han

estado en el suelo o que han sido saborizadas. Las muestras enviadas no deberían contener grandes cantidades de material orgánico, tal como alimento o materia fecal (Rel production).

4.17.2 Hisopado laríngeo

Los hisopado laríngeos en cerdos pueden requerir más capacitación para el personal, esto a fin de garantizar que las muestras sean recolectadas en el lugar adecuado y realizando una correcta manipulación de los cerdos (Pieters, 2014).

La recolección de la muestra se puede hacer de manera extremadamente rápida, en realidad, toma menos tiempo para ser recolectada, en comparación con una muestra de sangre, Para recolectar hisopos laríngeos, los cerdos pueden inmovilizarse simplemente con un lazo y el uso de una mordaza bucal y un laringoscopio, se recomienda para la seguridad del personal y para visualizar mejor el área en donde se realizará el hisopado (Pieters, 2014).

Una vez recolectadas, las muestras deben almacenarse adecuadamente y transportarse al laboratorio de diagnóstico tan pronto como sea posible para su procesamiento (Pieters, 2014; Fablet, 2010).

4.17.3 Hisopado traqueo-bronquial

En la fase crónica de la enfermedad, el muestro bronquial es más sensible para detectar *Mycoplasma hyopneumoniae*. Se caracteriza por recolectar muestras en animales post-mortem a través de hisopado traqueo-bronquiales.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Recursos humanos

Estudiante investigador

Asesores de tesis

Trabajadores de granja

Trabajadores de laboratorio

Trabajadores del rastro

5.1.2 Recursos de laboratorio

PCR en tiempo real (RT-PCR)

Reactivos VetMAX – kit de amplificación (kit comercial)

Kit purificador de ARN / ADN MagMAX

5.1.3 Recursos de campo

30 Cuerdas de algodón

30 Bolsas de plástico limpias

90 Tubos vacutainer®

1 Marcador permanente

1 Lapicero

1 Tijera

1 caja guantes

1 Abre boca

6 Sondas de inseminación

60 Hisopos

1 Hielera

1 Cuchillo

1 Overol

1 par de botas

7 Gabachas

7 Gorros

7 Mascarillas

1 Sujetador

5.1.4 Recursos biológicos

- 30 muestras de fluidos orales de cerdas reproductoras de diferentes edades.
- 30 muestras de hisopado laríngeo de cerdas reproductoras de diferentes edades.
- 30 muestras de hisopado traqueales y bronquiales en cerdas reproductoras de diferentes edades.

5.2 Metodología

5.2.1 Diseño de estudio

Exploratoria de corte transversal.

El presente trabajo de investigación se realizó en una granja tecnificada de cerdas reproductoras, en el departamento de Sacatepéquez, en los meses de noviembre de 2018 a febrero del año 2019, con el fin de evaluar 3 diferentes técnicas de toma de muestra (fluidos orales, hisopado laríngeo e hisopado traqueo-bronquial) para detección de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Como sujetos experimentales se utilizaron 30 cerdas reproductoras de diferentes edades, destinadas a rastro, serológicamente positivas a *Mycoplasma hyopneumoniae* (Anexo 11.6), a cada cerda se le realizó las tres diferentes técnicas de toma de muestra, obteniendo un total de 90 muestras. Los fluidos orales y el hisopado laríngeo se realizó un día antes que se enviarán las cerdas a rastro, al día siguiente, en rastro, se efectuó el hisopado traqueo-bronquial. Se sacaron muestras aproximadamente cada 21 días, alcanzando así el total de 30 cerdas.

5.2.2 Área de estudio

Sacatepéquez se encuentra situado en la región central de Guatemala. Limita el norte con el departamento de Chimaltenango, al este con el departamento de Guatemala, al sur con Escuintla y al oeste con el departamento de Chimaltenango. Su temperatura habitual es templada.



5.2.3 Procedimiento de la técnica de toma de muestra fluidos orales

- Se cortó las cuerdas de algodón, para luego realizarles un nudo en la parte posterior a modo que se desenredaran los hilos. Cada cuerda consistió de 4 hilos.
- Se colocaron las cuerdas de algodón en un lugar limpio del corral o de la jaula dependiendo donde se encontraban las cerdas, se ubicaron a la altura del hombro de las cerdas, esto para llamar más su atención.
- Los fluidos orales eran absorbidos a medida que las cerdas mordían las cuerdas.
- Las cuerdas permanecieron en el corral o en la jaula por 20-30 minutos y así se aseguró la exposición adecuada de las cuerdas a las cerdas.
- Obtenida las cuerdas con los fluidos orales, se introducía la punta de las cuerdas en una bolsa de plástico limpia, luego se exprimían para que el fluido oral se acumulará en la esquina de la bolsa, se depositaba los fluidos en tubos vacutainer®.
- Se obtenía como mínimo 1ml de muestra.
- Las cuerdas utilizadas se descartaban, estas no se reutilizaban con otras cerdas.
- Se identificaron los tubos con el número que presentaban las cerdas en el lomo y se depositaban en una hielera con refrigerante.
- En todo el proceso se utilizaron guantes estériles.

5.2.4 Procedimiento de la técnica de toma de muestra hisopado laríngeo

- Terminado el muestreo de la técnica de fluidos orales, se procedió a sujetar a las cerdas del hocico con un sujetador, se les colocó un abre boca para tener mejor visión.
- Se insertó los hisopos en la punta de las sondas de inseminación para tener mayor extensión a la laringe y evitar que el hisopo fuera tragado por las cerdas.

- Se introdujo el hisopo junto con la sonda a la laringe, llegando a lo más profundo se frotaba el hisopo en las paredes de la laringe a medida de coleccionar suficiente fluido.
- Obtenida la muestra, se depositaron los hisopos en tubos vacutainer®.
- Se identificaron los tubos con el número que presentaban las cerdas en el lomo y se depositaron en una hielera con refrigerante.
- En todo el proceso se utilizó guantes estériles.

5.2.5 Procedimiento de la técnica de toma de muestra hisopado traqueo-bronquial en animales post-mortem

- Al terminar de realizar las dos técnicas mencionadas anteriormente, el hisopado traqueo-bronquial se realizó al día siguiente en el rastro.
- Antes de realizar el hisopado, se entregaba un listado con los números de las cerdas que se muestrearon el día anterior, esto para que los pulmones ingresarán en orden al listado correspondiente. Con esta metodología se evitaba confusiones con pulmones de otras cerdas.
- Al momento de ingresar los pulmones al área, se examinaba cada lóbulo para observar las lesiones.
- Luego se realizaba un corte longitudinal con cuchillo en tráquea y en las lesiones más evidentes. Se realizó el hisopado en tráquea y en las lesiones evidentes, obteniendo la mayor muestra posible.
- Obtenida la muestra se depositaba el hisopo en tubos vacutainer®.
- Se identificaron los tubos con los números correspondiente del listado y se depositaron en una hielera con refrigerante.
- Este procedimiento se realizó con guantes estériles.

5.2.6 Traslado de las muestras al laboratorio

Al terminar de realizar los fluidos orales e hisopados laríngeos a las cerdas, los tubos con la muestra se depositaban en una hielera con refrigerante.

Estas muestras eran enviadas al laboratorio privado NAJARITO, el cual se ubicaba en villa nueva, en donde se les realizó la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR).

Al día siguiente, se realizó el muestreo en tráquea y bronquios en rastro, terminada la actividad, se depositaban los tubos en una hielera con refrigerante y se enviaban al laboratorio en donde se les realizó la técnica de Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR).

5.2.7 Procesamiento del análisis de las muestras con RT - PCR

Una vez trasladadas las muestras al laboratorio privado NAJARITO, este laboratorio se dedica a analizar muestras con el fin de contribuir con el estudio, prevención y diagnóstico de una enfermedad, por lo que las muestras fueron analizadas por la técnica de PCR en tiempo real, por un técnico especializado del laboratorio. Los resultados fueron reportados una semana después del ingreso de las muestras al laboratorio.

5.2.8 Técnica de RT – PCR

Reactivos VetMAX – kit de amplificación, mezcla de sondas de cebador TaqMan, para la amplificación por PCR en tiempo real.

Kit purificador de ARN / ADN MagMAX, Se utilizaron partículas magnéticas en un formato de 96 pocillos, los inhibidores del PCR se eliminan de manera efectiva en el proceso, lo que hace que el ácido nucleico resultante sea ideal para aplicaciones de PCR en tiempo real.

5.3 Variable respuesta

Para este estudio la variable respuesta es de tipo cualitativo nominal, ya que los resultados de las pruebas de PCR se presentaron como positivos a la presencia de *Mycoplasma hyopneumoniae* y negativos a la ausencia, según fue el caso.

5.4 Análisis de los resultados

Dada la naturaleza de la variable respuesta, los resultados fueron evaluados a través de la prueba de chi-cuadrado con bondad de ajuste donde se sometió a prueba la hipótesis o el supuesto de que la eficacia de las tres pruebas para la detección *Mycoplasma hyopneumoniae* es la misma. El análisis estadístico se realizó con megastat 2007, con un nivel de significancia del 5% ($\alpha = 0.05$), encontrándose diferencia estadística entre las 3 técnicas de toma de muestra (Ver anexo No.2).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuadro 1: Resultados de las tres técnicas a través de RT-PCR

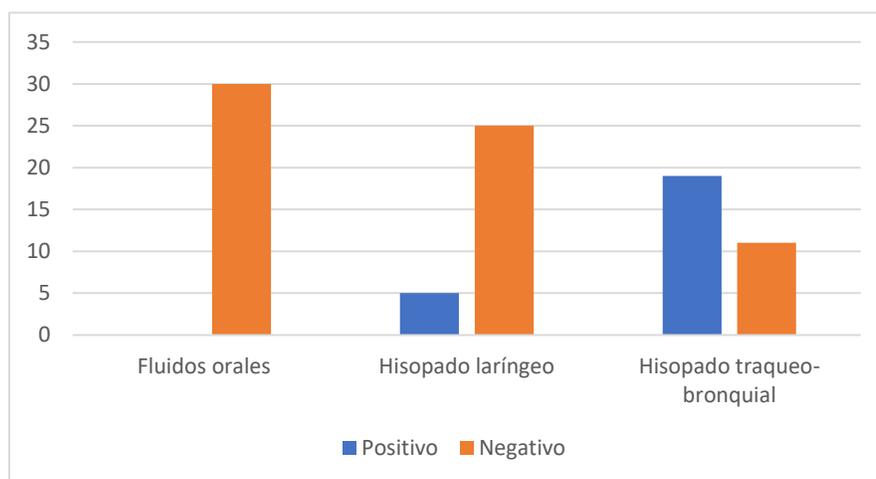
Resultados obtenidos a partir de la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae* mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (RT-PCR) para las tres técnicas de toma de muestra evaluadas en cerdas reproductoras de una granja tecnificada del departamento de Sacatepéquez, año 2018-2019.

Test	Positivo	Negativo	total	% de casos positivos
Fluidos orales	0	30	30	0%
Hisopado laríngeo	5	25	30	16.67%
Hisopado traqueo-bronquial	19	11	30	63.33%
Total	24	66	90	

Fuente: Elaboración propia en base a resultados de pruebas realizadas en cerdas reproductoras de una granja tecnificada en el departamento de Sacatepéquez.

Figura 1: Resultados positivos y negativos de las tres técnicas de toma de muestra

Resultados positivos y negativos de las tres diferentes técnicas de toma de muestra mediante la Reacción en cadena la Polimerasa en tiempo real (RT-PCR) para detección de *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdas reproductoras de una granja tecnificada del departamento de Sacatepéquez, año 2018-2019.



Fuente: Elaboración propia.

La prueba de chi-cuadrado indica que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre las tres técnicas de toma de muestra para detección de *Mycoplasma hyopneumoniae* en cuanto a los resultados positivos y negativos. Estos resultados sugieren que la técnica de toma de muestra mediante hisopados traqueo-bronquiales en animales post mortem, es diferente estadísticamente a las otras dos técnicas. (ver anexo 4)

En la tabla no. 1 se observan los resultados obtenidos mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (RT-PCR) para detección de *Mycoplasma hyopneumoniae* utilizando las 3 diferentes técnicas de toma de muestra. Estos resultados muestran que la técnica de fluidos orales fue la menos efectiva para la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae*, en la cual se obtuvo el 0% de resultados positivos. En el caso de la técnica de hisopado laríngeos se obtuvieron 5 muestras positivas de las 30 analizadas, lo cual representa el 16.67% de casos positivos.

El bajo porcentaje de resultados positivos observados en las 2 técnicas de toma de muestra *in vivo*, que corresponden a fluidos orales como a la técnica de hisopado laríngeo concuerdan con lo reportado por los autores Wise y Kim (1987), Caruso y Ross (1990) y Thacker (2004) citados por Pieters (2017) quienes describen que el diagnóstico *in vivo* de la infección por *Mycoplasma hyopneumoniae* en etapa temprana puede ser difícil por varias razones, entre ellas, la detección del antígeno que dependerá de la calidad de la muestra y el tiempo de recolección. De igual manera, cuando la respuesta inmunitaria no da una protección completa después de la exposición con el patógeno, lo cual conlleva a una colonización asintomática de los cilios respiratorios. (Ver cuadro 1)

Por otro lado, los resultados negativos pueden estar relacionados con lo que reporta Pieters (2009) que la colonización por *Mycoplasma hyopneumoniae* en la cerda se haya encontrado en el tracto respiratorio inferior, que es donde comúnmente el *Mycoplasma hyopneumoniae* prolifera en mayor número, lo cual

puede ser difícil de evaluar en la práctica debido a la dificultad de obtener muestras de diagnóstico *in vivo*.

De igual forma, los resultados de muestras tomadas en el tracto respiratorio superior ofrecen una sensibilidad más baja respecto al tracto inferior y es probable que sean la razón de obtener resultados negativos de acuerdo a lo reportado por Calsamiglia (1999), Otagiri (2005) y Fablet (2010) citados por Pieters (2017). (Ver anexo 3)

No obstante, los resultados obtenidos en el presente estudio difieren con lo reportado por la Universidad de Minnesota, en Estados Unidos (2017). En dicho estudio, los resultados de la PCR en tiempo real para muestras de hisopado laríngeos mostraron significativamente la mayor sensibilidad respecto a las técnicas de hisopado nasal y lavado traqueo-bronquial. Por lo tanto, sugieren que los hisopados laríngeos son muestras confiables para el diagnóstico temprano de la infección por *Mycoplasma hyopneumoniae*.

La laringe, razonablemente funciona como acceso de muestreo y proximidad a las vías respiratorias inferiores, por lo que se ha convertido en uno de los sitios preferidos de muestreo para la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae* (Pieters, 2017), sin embargo, en este estudio se demuestra que los resultados no son consistentes debido a que la laringe no es considerada la ubicación típica de la infección o colonización por el patógeno.

En el caso de los fluidos orales, Moreira *et al* (2007) sugiere que, cada vez que se obtienen muestras a través de un método no invasivo, se debe tomar en cuenta la presencia del *Mycoplasma hyopneumoniae* en estado de portador, la cual puede generar falsos positivos si el hallazgo no se estudia con la clínica. (Castro, 2009).

De igual manera, los resultados negativos de la técnica de fluidos orales pueden deberse en parte a que la bacteria puede sobrevivir solo un corto periodo de tiempo en condiciones ambientales moderados, lo cual, la boca es considerada un área aerobia ya que hay entrada de oxígeno, de igual manera esta bacteria es

sensible a las variaciones del ph, el ph de la saliva del cerdo es alcalino, por lo cual dichas situaciones hayan ocasionado que los fluidos orales no haya sido una técnica de toma de muestra efectiva para esta investigación. (Ver anexo 11.3)

Sin embargo, la alta concentración de *Mycoplasma hyopneumoniae* en los bronquios puede inducir a que la bacteria sea transmitida a la boca del cerdo a través de la tos, lo cual al realizar los fluidos orales pueden dar resultados positivos en algunas ocasiones (Anonimo, 2018; Castro, 2009).

Por su parte, los mejores resultados obtenidos fueron para la técnica de hisopado traqueo-bronquial (ver tabla no.1), esta técnica fue la más efectiva para la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae*, a través de esta técnica se obtuvieron 19 muestras positivas de 30 analizadas, la cual representa el 63.33% de casos positivos, teniendo el mayor porcentaje de resultados positivos, lo cual concuerda con Arruda (2018) quien menciona que los hisopados traqueo-bronquiales ofrecen una alta sensibilidad para la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Lo anterior concuerda con lo que sugiere el autor calsamiglia (1999) que las muestras que son realizadas directamente del pulmón son la fuente más apropiada para la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae* una vez que se sabe que el patógeno esté presente en el pulmón (Pieters, 2017).

La presentación de los resultados negativos de la técnica traqueo-bronquial se debe a que el *M. hyopneumoniae* se transmite muy lentamente ya que se adhiere al epitelio respiratorio y coloniza lentamente el tejido pulmonar, por lo que al momento de realizar el hisopado la bacteria no haya colonizado aún el pulmón (Anonimo, 2018).

VII. CONCLUSIONES

- La técnica de hisopado traqueo-bronquial en animales post-mortem fue la más efectiva para la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae* a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (RT-PCR).
- La técnica de fluidos orales fue la menos efectiva para la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae* a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (RT-PCR).
- Se observó diferencia significativa a través de la prueba de chi-cuadrado.

VIII. RECOMENDACIONES

- Realizar pruebas incluyendo la técnica de hisopado traqueo-bronquial en animales post-mortem para definir estatus sanitario de la granja.
- Realizar estudios utilizando dos diferentes técnicas de PCR, para comparar resultados de PCR en tiempo real con PCR anidado.
- Realizar estudios correlacionales entre los resultados del análisis de PCR y los grados de lesiones pulmonares asociadas a *Mycoplasma hyopneumoniae*.
- Realizar estudios relacionando signos presentes en los cerdos con los resultados del análisis de PCR.

IX. RESUMEN

El presente trabajo fue realizado en una granja tecnificada ubicada en el departamento de Sacatepéquez, en donde se muestrearon 30 cerdas reproductoras, utilizando 3 diferentes técnicas de toma de muestra haciendo un total de 90 muestras. El objetivo del trabajo fue comparar cuál de las 3 técnicas de toma de muestra (fluidos orales, hisopado laríngeo, hisopado traqueo-bronquial) fue más efectiva para la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae* a través de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR).

Para esta prueba se utilizó como herramientas: cuerdas de algodón para los fluidos orales; sujetador, abre boca, sonda de inseminación, hisopos para el hisopado laríngeo y el hisopado traqueo-bronquial, cada muestra se colocó en tubos vacutainer®.

Para este estudio la variable respuesta fue de tipo cualitativo ya que los resultados de las pruebas de PCR en tiempo real solo se presentaron como positivos o negativos. Los resultados fueron evaluados a través de la prueba de chi-cuadrado con bondad de ajuste, por lo tanto, los resultados indicaron que si existe diferencia significativa entre las 3 técnicas de toma de muestra que se evaluaron para la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Se obtuvieron 0 positivos en la técnica de fluidos orales, 5 en la técnica de hisopado laríngeo y 19 en la técnica hisopado traqueo-bronquial. La colonización por *Mycoplasma hyopneumoniae* en la cerda puede que se haya encontrado en el tracto respiratorio inferior, que es donde comúnmente el *Mycoplasma hyopneumoniae* prolifera en mayor número, por lo cual los positivos en las técnicas in vivo hayan sido bajas.

Las muestras de hisopado traqueo-bronquial en animales post-mortem analizadas por PCR en tiempo real fue la más efectiva para la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

SUMMARY

The present work was carried out in a technified farm located in the department of Sacatepéquez, where 30 breeding sows were sampled, using 3 different sampling techniques making a total of 90 samples. The objective of the work was to compare which of the 3 sampling techniques (oral fluids, laryngeal swab, tracheo-bronchial swab) was the most effective for detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by using the Real Time Polymerase Chain Reaction methodology (RT-PCR).

For this trial, cotton cords were used as tools for the oral fluids technique; while for both laryngeal swab and tracheo-bronchial fluids technique a mouth opener gag and pig holder was used as tools. All the sample were kept on vacutainer® tubes.

The response variable for this study was a qualitative one, due to results were settled as positive or negative. Results were analyzed by chi-square goodness-of-fit test, wich showed a statistical differences between the 3 sampling techniques for detection of *Mycoplasma hyopneumoniae*.

A total of 0, 5 and 19 positives samples were obtained for oral fluid technique, laryngeal swab technique and tracheo-bronchial swab technique, respectively. Colonization of *Mycoplasma hyopneumoniae* in the sow may have been found in the low-respiratory tract, where is commonly a most proliferation, so this can explain the less efectiviness for in vivo techniques.

The Tracheo-bronchial swab technique in post-mortem animals analyzed by real-time PCR was the most effective for detection of *Mycoplasma hyopneumoniae*.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anonimo. (2018). Herramientas diagnosticas para el abordaje de *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Porcinews*.
- Arruda, P. R. (2018). General overview of the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA by quantitative polymerase chain reaction in diagnostic cases submitted to the Iowa State University Veterinary Diagnostic Laboratory from 2004 to 2016. *Peer Reviewed*. Vol. 26, p 309-315.
- Calderon, R. (Marzo de 2015). *Analisis de la información del censo porcino de traspatio y determinación de la cobertura de vacunación del programa de peste porcina clásica, años 2011-2013 (Tesis)*. Obtenido de Maga: <http://visar.maga.gob.gt/visar/2015/sa/ppc/censo-porcino.pdf>
- Carranza, A. (2006). *Neumonía enzootica porcina. UNRC, Río cuarto*. Obtenido de UNRC: http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_porcina/00-v-congreso_prod_porcina/14-carranza_111.pdf
- Castro, L. S. (2009. v.61, n.1.). Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lungs and nasal swabs of pigs by nested PCR . *Scielo*, p.149-155.
- Chavez, G. y. (octubre de 2012). *Describir la distribución y densidad de la población porcina de traspatio y determinación de la cobertura de la vacunación de los cerdos de traspatio en el programa de emergencias del territorio nacional, en Fase de control de PPC MAGA - OIRSA (Proyecto)*. Obtenido de Maga: <http://visar.maga.gob.gt/visar/sa/ppc/proyecto-reg.pdf>.
- De Dios, e. a. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Medigraphic*, 2(2), p 70-78.
- Fablet, C. M. (2010). Estimation of the sensitivity of four sampling methods for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in live pigs using a Bayesian approach. *Veterinary Microbiology* , 143(2-4) 238:45. Doi: 10.1016/j.vetmic.2009.12.001.
- Fano, E. P. (2007). Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization at weaning on disease severity in growing pigs. *Can J vet res*, 71(3).
- Hegel, A. (marzo de 2010). *Aplicación de la serología para en control de Mycoplasma hyopnuemoniae en cerdos (Tesis)*. Universidad San Carlos de Guatemala. Obtenido de Tesis:

- <http://www.repositorio.usac.edu.gt/3021/1/Tesis%20Med%20Vet%20Andrea%20Hegel.pdf>
- Lobo, E. (octubre, 2005). *Mycoplasma hyopneumoniae* y su relación con los procesos respiratorios del cerdo. *Redvet*, VI, No. 10.
- Maes, D. V. (1996). Enzootic pneumonia in pigs. *Veterinary Quarterly*, 18(3), p 104-109. Doi: 10.1080/01652176.1996.9694628.
- Neyoy, C. (mayo de 2014). *Tipos de PCR*. Obtenido de <http://apuntesbiologiamol.blogspot.com/2014/05/tipos-de-pcr.html>
- Pieters, M. (Abril de 2014). *Mycoplasmal Pneumonia: Proper Sample Collection is Crucial for Pathogen Detection and Accurate Diagnosis in Live Pigs*. . Obtenido de <https://www.nationalhogfarmer.com/hog/new-isu-extension-swine-specialist-named>
- Pieters, M. D. (2017). Comparison of simple types and diagnostic methods for in vivo detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* during early stage of infection. *Veterinary Microbiology*, 103-109. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.02.014.
- Pijoan, C. (s.f.). *Neumonía enzootica de los cerdos (Tesis)*. UNAM. Obtenido de UNAM: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol1/CV1v1c03.pdf>
- Rel production. (s.f.). *Recolección de fluidos orales en cerdos*. Obtenido de <http://www.securepork.org/Resources/Oral-Fluid-Collection-Booklet-Spanish.pdf>
- Sacristan, R. (2014). *Treatment and control of Mycoplasma hyopneumoniae infecciones (Tesis)*. Ghent University. Obtenido de Ghent: http://www.rohh.ugent.be/v3/research/phd/2014/delPozoSacristan_R.pdf
- Torres, M. (2003). *Determinación serologica de la infección con Mycoplasma hyopneumoniae en una granja de cerdos de crianza intensiva (Tesis)*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Obtenido de Tesis: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/1236/Torres_a_m.pdf;jsessionid=6582536CD1A104736CF879FD760D015C?sequence=1
- UNED. (mayo de 2000). *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*. Obtenido de <http://cosmolinux.no-ip.org/uned/pcr.pdf>

XI. ANEXOS

Anexo 11.1 Fundamento estadístico de la prueba

Fundamento estadístico de la prueba

La prueba de chi-cuadrado de bondad de ajuste es una prueba que se deriva de la distribución normal, se utiliza cuando se quiere decidir si existe incompatibilidad entre las distribuciones de frecuencias observadas y las distribuciones de frecuencias esperadas (distribución predeterminada o hipotética), de una variable aleatoria. El estadístico de prueba (X^2 calculado) se calcula según la siguiente ecuación:

$$X^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

o_i representa a cada frecuencia observada y

e_i representa a cada frecuencia esperada

La frecuencia esperada se calcula: total filas * total columnas/ N, tanto para resultados positivos como resultados negativos de las 3 técnicas de toma de muestra que se pusieron a prueba para la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Al momento de tener los resultados de PCR y por ende el resultado del chi-cuadrado es importante evaluar si la hipótesis se cumple o no, si el chi-cuadrado calculado es mayor o igual al chi-cuadrado crítico que es de 5.9915, la hipótesis nula se anula.

Anexo 11.2 Análisis estadístico con la prueba de Chi-cuadrado con bondad de ajuste

Ho: No existe diferencia significativa entre las 3 técnicas de toma de muestra que se evaluaron para la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Ha: Si existe diferencia significativa entre las 3 técnicas de toma de muestra que se evaluaron para la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

El método estadístico utilizado fue la Prueba de Chi cuadrado con un grado de confianza del 0.05 y con 2 grados de libertad, para determinar si existió diferencia entre las 3 técnicas de toma de muestra.

Se utilizó la siguiente fórmula:

$$X^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

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

Anexo 11.3 Tabla no. 2 Resultados del laboratorio de las 3 técnicas de toma de muestra

Resultados del laboratorio a través de la Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) de las 3 técnicas de toma de muestra para detección de *Mycoplasma hyopneumoniae*, en 30 cerdas reproductoras de una granja tecnificada, en el departamento de Sacatepéquez, año 2018-2019.

Fecha de muestreo	Número de cerda	Fluidos orales	Hisopado laríngeo	Hisopado traqueo-bronquial
13/11/2018	1593	-	-	-
13/11/2018	1478	-	-	-
13/11/2018	1381	-	-	-
13/11/2018	1309	-	-	-
13/11/2018	1272	-	-	-
3/12/2018	1507	-	-	-
3/12/2018	1501	-	-	-
3/12/2018	1505	-	-	-
3/12/2018	1413	-	-	-
3/12/2018	1497	-	-	-
14/12/2018	1	-	-	+
14/12/2018	2	-	-	+
14/12/2018	4	-	-	+
14/12/2018	7	-	-	+
14/12/2018	9	-	-	+
23/12/2018	11	-	+	+
23/12/2018	10	-	-	+
23/12/2018	2	-	+	+
20/1/2019	1	-	+	+
20/1/2019	2	-	-	+
20/1/2019	5	-	-	-
20/1/2019	6	-	-	+
20/1/2019	8	-	+	+
20/1/2019	9	-	-	+
3/2/2019	1	-	-	+
3/2/2019	2	-	-	+
3/2/2019	3	-	-	+
3/2/2019	6	-	-	+
3/2/2019	8	-	-	+
6/2/2019	1	-	+	+

Anexo 11.4 Tabla no. 3 Prueba de chi- cuadrado de los resultados obtenidos.

Prueba de chi-cuadrado de los resultados obtenidos de las tres técnicas de monitoreo para detección de *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdas reproductoras de una granja tecnificada del departamento de Sacatepéquez, año 2018-2019.

Frecuencias absolutas

En columnas: resultado			
test	Negativo	positivo	Total
Fluidos orales	30	0	30
Hisopado laríngeo	25	5	30
Hisopado traqueo-bronquial	11	19	30
Total	66	24	90

Estadístico	Valor crítico	Valor	Gl	P
Chi Cuadrado Pearson	5.9915	33.07	2	<0.0001

En donde Gl son los grados de libertad
Y P probabilidad de error.

Tabla no. 4

Técnica	Modelo	Observada	Esperado
Fluidos orales	0.3333	0	8
Hisopado laríngeo	0.3333	5	8
Hisopado traqueo-bronquial	0.3333	19	8
	1	24	24

Aplicación de fórmula de positivos y negativos

$$X^2 = \frac{(0-8)^2}{8} + \frac{(5-8)^2}{8} + \frac{(19-8)^2}{8} = 8 + 1.25 + 15.125 = \mathbf{24.25}$$

$$X^2 = \frac{(0-22)^2}{22} + \frac{(5-22)^2}{22} + \frac{(19-22)^2}{22} = 2.91 + 0.41 + 5.5 = \mathbf{8.82}$$

} **33.07**

Al aplicar la fórmula del chi-cuadrado a los resultados positivos y negativos obtenidos del PCR de las 3 técnicas de toma de muestra, la sumatoria de ambas dio un resultado de 33.07, lo cual el chi-cuadrado calculado (33.07) supero al chi-cuadrado teórico (5.9915), por lo tanto, si existe diferencia significativa entre las 3 técnicas de toma de muestra que se evaluaron para la detección de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Anexo 11.5 Fichas de control de resultados de las 3 técnicas de toma de muestra

Ficha no. 1

Ficha de control de resultados de fluidos orales

Fluidos orales

Fecha de toma de muestras	No. de cerda	Resultados

Ficha no. 2

Ficha de control de resultados de hisopado laríngeo.

Hisopado laríngeo

Fecha de toma de muestras	No. de cerda	Resultados

Ficha no. 3

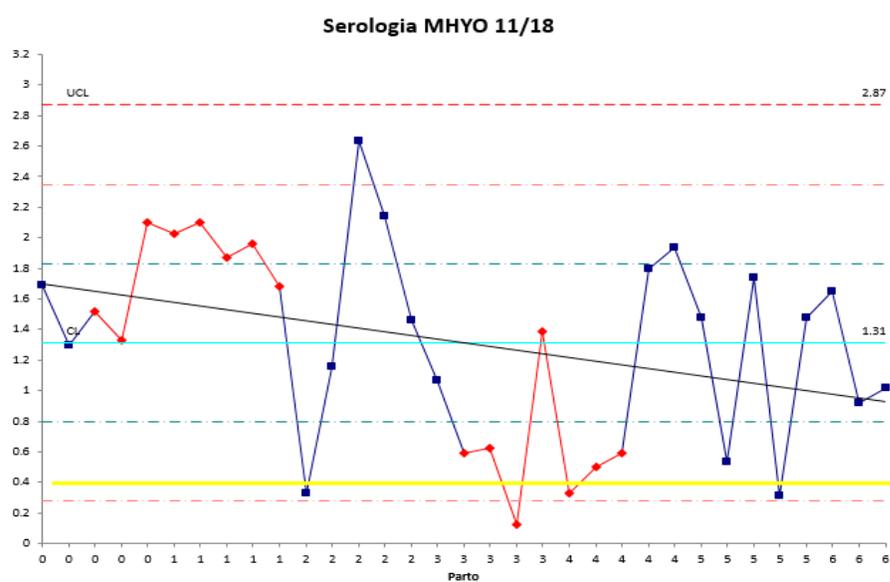
Ficha de control de resultados de hisopado en tráquea y bronquios.

Hisopado en tráquea y bronquios

Fecha de toma de muestras	No. de cerda	Resultados

Anexo 11.6 Gráfica de serología de *Mycoplasma hyopneumoniae* de la granja tecnificada

Gráfica de serología de *Mycoplasma hyopneumoniae* del mes de noviembre del 2018 de la granja tecnificada donde se realizó el estudio.



Anexo 11.7 Técnica de toma de muestra de fluidos orales

Muestra de fluidos orales obtenida de una cerda reproductora bajo estudio de la granja tecnificada.



Imagen: Granja tecnificada

Anexo 11.8 Técnica de toma de muestra hisopado laríngeo

Hisopado laríngeo a una cerda reproductora bajo estudio de la granja tecnificada.



Imagen: Granja tecnificada

Fluido extraído de la laringe de la cerda reproductora de la imagen anterior.



Imagen: Granja tecnificada

Anexo 11.9 Examen de los lóbulos pulmonares

Examen de los lóbulos pulmonares de una cerda reproductora de la granja tecnificada, en la cual se observa lesión evidente en el lóbulo apical.

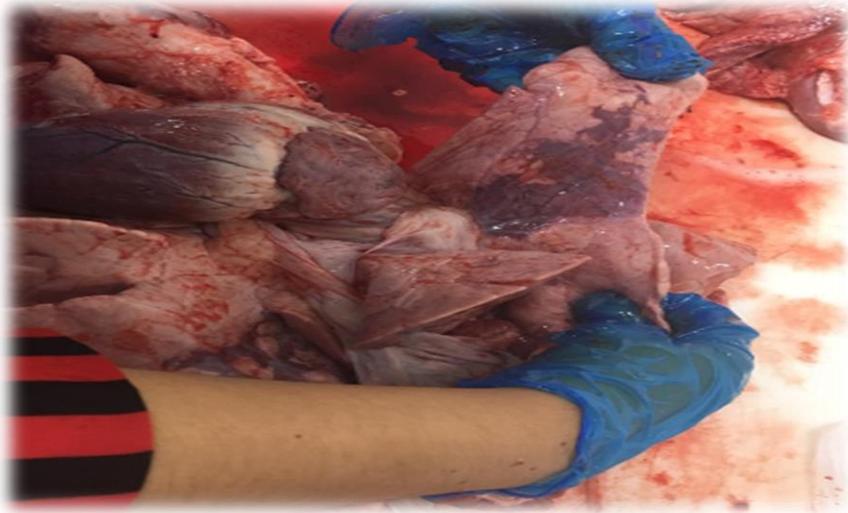


Imagen: Rastro

Técnica de toma de muestra hisopado traqueo-bronquial en un pulmón de una cerda reproductora bajo estudio.

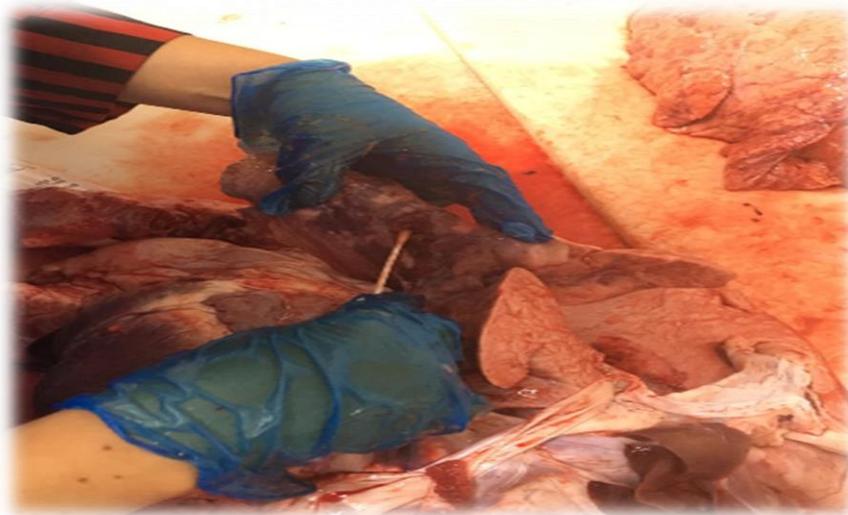
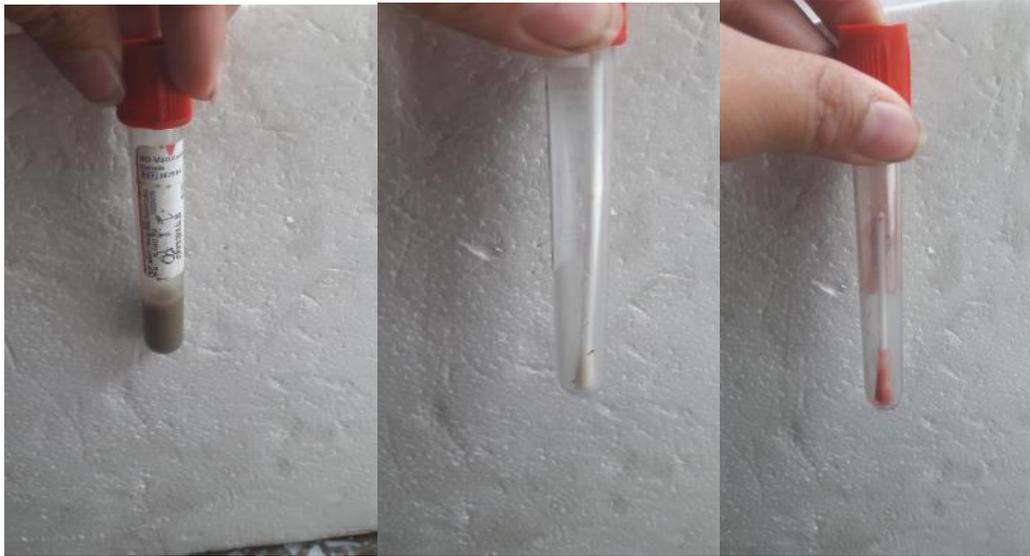


Imagen: Rastro

Anexo 11.10 Muestras recolectadas en tubos vacutainer

Muestras recolectadas en tubos vacutainer (fluidos orales, hisopado laríngeo, hisopado traqueo-bronquial) de cerdas reproductoras de una granja tecnificada en el departamento de Sacatepéquez, año 2018-2019



Anexo 11.11 Grados de lesión en el pulmón por *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Grado 0 Sin lesión aparente: 0% de tejido pulmonar afectado.

Grado 1 Lesión levemente extensa: 1-5% del tejido pulmonar.

Grado 2 Lesión moderadamente extensa: 6-10%

Grado 3 Lesión severamente extensa: extensión mayor al 11%.

Fuente: Guzmán, H *et al.*