

CORRELACIÓN ENTRE LAS LESIONES MACROSCÓPICAS E HISTOPATOLÓGICAS DE LA NEUMONÍA ENZOÓTICA Y LA DETECCIÓN DEL *Mycoplasma hyopneumoniae* POR PCR ANIDADA EN LAVADOS BRONCO ALVEOLARES EN CERDOS AL SACRIFICIO

Guzmán H¹, Mogollón JD², Rincón MA³, Lora AM⁴

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad
de Ciencias Aplicadas y Ambientales UDCA.
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia
Universidad Nacional de Colombia.
Instituto Colombiano Agropecuario ICA-CEISA.

RESUMEN

Mycoplasma hyopneumoniae es el agente etiológico primario de la Neumonía Enzoótica (NE) de los porcinos, y es el agente de mayor importancia involucrado en el Complejo Respiratorio Porcino (CRP). El propósito de este trabajo fue evaluar las lesiones en pulmones de 55 cerdos en planta de sacrificio procedentes de granjas de producción intensiva; las muestras fueron tomadas en forma aleatoria con base en lesiones sugestivas de NE y pulmones aparentemente normales como controles para análisis histopatológico y para detección de ADN de *Mycoplasma hyopneumoniae* en lavados bronco alveolares por PCR anidada. Las lesiones macroscópicas fueron evaluadas en términos de porcentaje de afección y las lesiones histopatológicas fueron clasificadas (de 0-4 según escala de severidad subjetiva), de acuerdo con el grado de hiperplasia de agregados linfoides asociados a bronquios, bronquiolos y vasos sanguíneos (BALT). Mediante la técnica de PCR anidada fueron positivas 54 de 55 muestras. Las lesiones histopatológicas del BALT mostraron alta correlación con los hallazgos macroscópicos y con lesiones microscópicas de hiperplasia de células epiteliales e infiltración de células inflamatorias en vías aéreas. Los resultados demostraron que el PCR anidado es una herramienta complementaria importante para el diagnóstico de la presencia de *Mycoplasma hyopneumoniae* en afecciones respiratorias asociadas con NE y CRP de los porcinos al sacrificio.

Palabras clave: *Mycoplasma hyopneumoniae*, cerdos, PCR anidada, histopatología.

1 hervetun@gmail.com

2 porcicol1@terra.com.co

3 rinconmonroy@yahoo.com

4 angelamlora@yahoo.com

CORRELATION BETWEEN THE PRESENCE OF BOTH GROSS AND HISTOPATHOLOGICAL LESIONS OF ENZOOTIC PNEUMONIA, AND DETECTION OF *Mycoplasma hyopneumoniae* IN BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FLUIDS BY NESTED-PCR OF SLAUGHTER PIGS.

ABSTRACT

Mycoplasma hyopneumoniae is primary etiologic agent of Enzootic Pneumonia of Swine (EPS), world wide spread, and is the most prevalent and important infectious agent involved in the porcine respiratory complex (PRDC). The purpose of this study is recording the lesions of 55 pigs at slaughter plant from 5 farms of swine herds, aleatory sampled for histopathology and detection of DNA of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchoalveolar lavages fluids by nested-PCR technique, and statistic study to correlation. The criterion for lungs sampling is based on suggestive lesions of EPS, that consist of craneo-ventral bronchopneumonic areas, and grossly normal lungs to controls that were processed in ICA-CEISA Laboratories, Bogotá. The results of nested-PCR were scored positive or negative, and gross lesions were graded. The histopathological lesions were graded 0-4, according to the *M. hyopneumoniae*-like lesions as BALT hyperplasia, epithelial cells hyperplasia, infiltration of inflammatory cells into the airways, emphysema, haemorrhage, atelectasia, alveolar and interlobulillar septal thickening, with category 0 for lungs without lesions and category 4 for lungs with severe lesions.

Nested-PCR was positive in 54 of 55 samples. The BALT histopathological lesions showed high correlation with epithelial cell hyperplasia, infiltration of inflammatory cells into airways, as slaughter finding. The results demonstrate that nested-PCR is a valuable complement diagnosis to the presence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in respiratory affections of Enzootic Pneumonia or PRDC in slaughter pigs.

Key words: *Mycoplasma hyopneumoniae*, pigs, nested PCR, histopathology.

INTRODUCCIÓN

El *Mycoplasma hyopneumoniae* es una bacteria de la clase *Mollicutes*, por lo tanto carece de pared; sin embargo, es considerado como GRAM negativa. Es un parásito extracelular que se adhiere a los cilios del epitelio del tracto respiratorio medio y bajo de los porcinos. Es el agente etiológico primario de la neumonía enzoótica, y uno de los principales patógenos involucrados en el complejo respiratorio porcino (CRP). La neumonía enzoótica es una enfermedad de distribución mundial, de curso crónico, caracterizada por alta morbilidad y baja mortalidad, que causa cuantiosas pérdidas económicas representa-

das en baja conversión alimenticia, disminución en la ganancia de peso y reducción del consumo de alimento (1), alcanzando su máximo impacto al final del destete e inicio del crecimiento y la finalización.

El diagnóstico de rutina para la neumonía enzoótica y, en particular, del *Mycoplasma hyopneumoniae* en nuestro país se lleva a cabo por signología clínica, hallazgos de necropsia, histopatología, detección de anticuerpos en sueros sanguíneos y de calostro por la prueba de ELISA, y mediante el aislamiento de agentes bacterianos secundarios con determinación de sensibilidad a antibióticos.

La prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada en lavados bronco-alveolares e hisopados nasales para detectar el ADN del *Mycoplasma hyopneumoniae* es de reciente implementación y permite detectar desde 10^2 mycoplasmas (2).

El propósito de la presente investigación fue establecer la correlación entre las lesiones macroscópicas e histopatológicas de la neumonía enzoótica, y la detección del *Mycoplasma hyopneumoniae* en lavados bronco alveolares por PCR anidada en pulmones de cerdos al sacrificio.

MATERIALES Y MÉTODOS

COLECCIÓN DE MUESTRAS

La colección de muestras se realizó en una planta de sacrificio ubicada en Bogotá D.C., donde se tomaron al azar 55 muestras, de las cuales 43 presentaron lesiones pulmonares anteroventrales sugestivas de neumonía enzoótica, y 12 pulmones aparentemente sanos como controles. Los animales procedían de cinco granjas de producción intensiva localizadas en la zona central del país.

Para el análisis histopatológico fueron colectados fragmentos de pulmón en frascos con formalina bufferada al 10%, y para PCR anidada se tomaron fragmentos de los lóbulos pulmonares en bolsas plásticas estériles con cierre hermético.

EXAMEN MACROSCÓPICO

La evaluación macroscópica del tejido pulmonar se realizó mediante el esquema utilizado y propuesto por Hannan, 1982 (3, 4, 5, 6, 7). Los rangos de porcentaje de la lesión pulmonar sugestiva de neumonía enzoótica se agruparon tomando como referencia los estudios de bases de datos publicados en los años 2001 y 2002 (8) y (9). Los criterios utilizados fueron los siguientes:

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%.

EVALUACIÓN MICROSCÓPICA

Los fragmentos de pulmones fijados en formalina al 10% fueron incluidos en parafina y procesados por el método rutinario para la elaboración de secciones histológicas, y luego teñidos con hematoxilina eosina. Las muestras para histopatología fueron procesadas en el Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA).

La evaluación por microscopía de luz se realizó con base en el grado de hiperplasia y la lesión del tejido linfoide asociado a bronquios, bronquiolos y vasos sanguíneos (BALT), siguiendo el método semi-cuantitativo propuesto por Livingston (1972) (citado por 3, 10) y por Morris et ál., (citado por 3, 10, 7) como se describe a continuación:

Grado 0: no se presentan cambios morfológicos.

Grado 1: leve hiperplasia del BALT.

Grado 2: leve a moderada hiperplasia del BALT, con leve infiltrado de macrófagos, linfocitos y neutrófilos en vías aéreas y alvéolos.

Grado 3: hiperplasia peri bronquial, peri bronquiolar y peri vascular linfoplasmocitaria, hiperplasia de neumocitos tipo II, edema alveolar, infiltración por neutrófilos, células plasmáticas y macrófagos en vías aéreas y alvéolos.

Grado 4: lesiones descritas en el grado 3 de mayor severidad, con obliteración de la luz bronquiolar por severa hiperplasia del BALT y exudado que abarca la luz de bronquiolos y de alvéolos.

Las otras lesiones microscópicas observadas –infiltrado mononuclear (MN) en bronquios, bronquiolos y luz alveolar; infiltrado polimorfonuclear (PMN) en bronquios bronquiolos y luz alveolar; hiperplasia del epitelio bronquial y bronquiolar; engrosamiento de septos alveolares; presencia de fibrina en luz alveolar y en septos interlobulillares; hemorragias; abscesos; granulomas; atelectasia; enfisema; daño de cilias– fueron calificadas con escala de 0 a 4 de acuerdo con el grado de severidad (7).

Detección del *Mycoplasma hyopneumoniae* por PCR anidada

La extracción de ADN de los lavados bronco-alveolares se llevó cabo por digestión con *proteinasa K* (9) de acuerdo con el protocolo estandarizado en el laboratorio de Medicina de Porcinos del Laboratorio Nacional de Diagnóstico Veterinario del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) (2).

Para minimizar el riesgo potencial de contaminación cada paso de PCR anidado se efectuó en tres compartimientos separados (extracción del ADN, amplificación del ADN y electroforesis).

Una vez llevado a cabo el proceso de extracción de ADN se realizó la amplificación de la porción específica del genoma siguiendo el protocolo para la primera reacción con mezcla de dinucleótidos, Taq DNA polimerasa, y la adición de los cebadores externos para el gen ribosomal 16 S(16S rARN) cuyas secuencias correspondían a: External Forward 5'-GAG CCT TCA AGC TTC ACC AAG A-3', external Reverse 5'-TGT GTT AGT GAC TTT TGC CAC C-3' (11, 12, 2, 13).

Para la segunda reacción se adicionó a cada una de las muestras, a los amplificadas en la primera reacción (fragmento de 649 pb), los reactivos y los cebadores internos correspondientes, así: mezcla de dinucleoti-

dos, Taq DNA polimerasa y la adición de los cebadores internos para el gen ribosomal 16 S(16S rRNA) cuyas secuencias correspondían a: Internal Forward 5'-ACT AGA TAG GAA ATG CTC TAG T-3', Internal Reverse 5'-GTG GAC TAC CAG GGT ATC T-3' (3, 1), a ligarse en el fragmento de 649 pares de bases y llevar a cabo en el termociclador el segundo ciclo de reacciones (11, 2).

Las muestras finalmente fueron analizadas por electroforesis en gel agarosa y visualizadas por luz ultravioleta en un transiluminador, usando como agente revelador bromuro de etidio. Los resultados fueron registrados mediante fotografías utilizando películas polaroid (11, 2).

MÉTODO ESTADÍSTICO

Basados en un modelo descriptivo, los resultados obtenidos en cada prueba se analizaron estadísticamente para establecer el coeficiente de correlación y la desviación estándar. Se calculó la desviación estándar del coeficiente de correlación para establecer el rango en el cual se encontraba el valor obtenido para asegurar la interpretación (14).

RESULTADOS

De los hallazgos macroscópicos que se encontraron en el total de pulmones estudiados, el 78,18% presentaron lesiones aparentes de NE, y el 21,82% de los pulmones evaluados no presentaron dichas lesiones (tabla1).

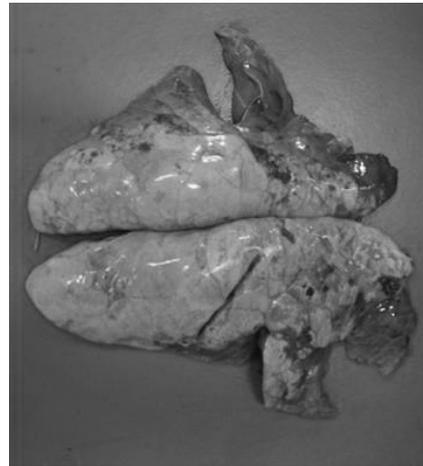
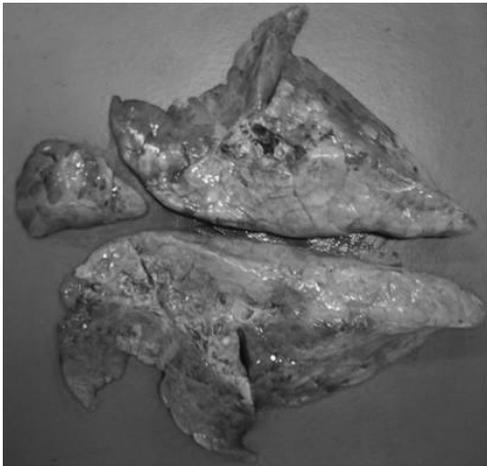
Se evaluó la frecuencia de afección de cada lóbulo pulmonar encontrando que los lóbulos cardíaco derecho, cardíaco izquierdo y apical derecho fueron los más frecuentemente afectados, y los lóbulos cardíacos derecho e izquierdo presentaron mayor extensión de lesión pulmonar (figura 1).

Tabla 1. Lesiones macroscópicas de pulmones y lóbulos pulmonares en porcentaje de extensión y en frecuencia de presentación

Lóbulo	lado	% lesión por extensión	% lesión por frecuencia
Apical	derecho	2,42	50,91
Cardiaco	derecho	3,85	69,09
Apical	izquierdo	1,89	47,27
Cardiaco	izquierdo	3,24	61,82
Accesorio		1,73	49,09
Diafragmático	derecho	1,29	38,18
Diafragmático	izquierdo	0,76	32,73
Total		15,18	76,36

Microscópicamente se diferenciaron varios patrones de lesión pulmonar; entre los más frecuentes se encontraron bronconeumonía supurativa, neumonía broncointersti-

cial supurativa, y la hiperplasia de BALT. También se encontraron cortes de pulmón caracterizados por neumonía intersticial o con granulomas.

**Figura 1.** Lesiones macroscópicas de neumonía enzoótica. Se observan las lesiones caracterizadas por áreas de coloración rosada grisácea, con áreas de atelectasia en porciones anteriores y ventrales de lóbulos pulmonares.

En la evaluación microscópica se identificaron lesiones de BALT (figura 2) cuyo grado de hiperplasia para el total de pulmones se valoró en promedio en 2,9. Del total de los pulmones evaluados se estableció el número y porcentaje de pulmones afectados en cada grado de lesión del BALT para observar la distribución (tabla 2).

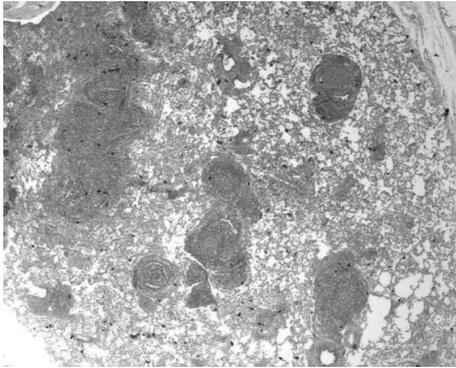


Figura 2. Neumonía enzoótica porcina. Pulmón con hiperplasia BALT grado 4. Obsérvese la severa hiperplasia del BALT que colapsa la luz de los bronquiolos. En la luz alveolar se encontró un moderado infiltrado mixto y atelectasia. Coloración de hematoxilina eosina.

Tabla 2. Lesiones microscópicas de hiperplasia de agregados linfoides asociados a bronquios, bronquiolos y vasos sanguíneos

Grado de lesión BALT	Número pulmones afectados	% pulmones afectados
0	1	0
1	7	14,54
2	8	14,54
3	18	32,72
4	21	38,18

En los pulmones sin cambios macroscópicos las lesiones de BALT fueron de grado 0 en un pulmón; de grado 1 en cinco pulmones; grado 2 en cuatro pulmones, y grado 3 en dos pulmones. En general, las otras lesiones microscópicas más frecuentes fueron: daño de cilias, infiltración de polimorfonu-

cleares neutrófilos (PMN) en luz alveolar de bronquios y bronquiolos, infiltración de células mononucleares (plasmáticas, macrófagos, linfocitos) en luz alveolar, bronquios y bronquiolos.

De las 55 muestras evaluadas por PCR, 54 (98,18%) fueron positivas al *Mycoplasma hyopneumoniae*, incluyendo casos positivos de pulmones en los que no observaron lesiones aparentes de NE. La muestra con resultado negativo no presentó hallazgos macroscópicos ni microscópicos (figura 3).

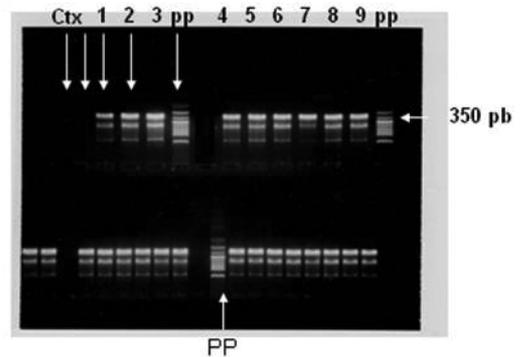


Figura 3. Detección de *Mycoplasma hyopneumoniae* por PCR anidado en lavados traqueobronquiales de cerdos de sacrificio. La línea pp corresponde al marcador de patrón de peso molecular. El canal Ctx corresponde a controles negativos. Los canales 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 9 corresponden a resultados positivos de muestras de cerdos de sacrificio, y los canales 1 y 8 a controles positivos. A la derecha la flecha horizontal blanca muestra la altura a la cual la escala que expresa el patrón de peso molecular corresponde a 351 pares de bases.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Teniendo en cuenta que 54 muestras evaluadas por PCR fueron positivas, y que esta prueba no se comportó como variable sino como constante, sólo se realizó el análisis de correlación para los cambios macroscópicos y microscópicos.

Al correlacionar el porcentaje de lesión macroscópica con la lesión microscópica del grado de hiperplasia del BALT, se obtuvo

un valor de 0,55 (0,664 – 0,436) interpretado como una correlación alta.

Los otros hallazgos microscópicos evaluados se correlacionaron con respecto al grado de lesión en BALT. Con estos resultados se demostró una correlación alta entre las lesiones del BALT con daño en cilios e hiperplasia de epitelio bronquiolar con valores respectivos de 0,595 (0,485-0,705) y 0,665 (0,563-0,767).

DISCUSIÓN

En el presente estudio, el promedio de los hallazgos macroscópicos de lesiones compatibles con neumonía enzoótica en pulmones de cerdos al sacrificio fue del 15,18% por extensión de lesiones, y del 76,36% por frecuencia de afección de los lóbulos pulmonares examinados. En un estudio realizado en 1992, "Caracterización patológica de la neumonía enzoótica en porcinos sacrificados en Santa Fe de Bogotá", se reportaron lesiones de neumonía enzoótica con mayor implicación del pulmón derecho, detectando un promedio de daño pulmonar de 20,56% en un muestreo de 300 animales en plantas de beneficio, coincidiendo con los resultados obtenidos en este estudio (15). Por otra parte, microscópicamente el grado de lesión del BALT (más relacionada con NE) fue en promedio de 2,9, en una escala de severidad de 0 a 4 resultó ser muy importante. De los 12 pulmones que no presentaron lesiones macroscópicas se encontraron hallazgos sugestivos de neumonía enzoótica por hiperplasia del BALT, correspondientes a los grados 3 y 4, en el 50% de las muestras.

Los hallazgos histológicos relacionados con neumonía enzoótica (NE) soportados en cambios morfológicos siempre han sido motivo de controversia, en particular si las lesiones microscópicas son leves y clasificadas como hiperplasia del BALT grados 1 y 2. En este estudio las muestras con hiperplasia del BALT grados 1 y 2 resultaron posi-

vas a la detección de ADN de *Mycoplasma hyopneumoniae*, pero no tenían cambios morfológicos que permitieran inferir el diagnóstico de neumonía enzoótica. Otros trabajos de investigación han corroborado esta hipótesis mediante el análisis de información que logró concluir por el análisis de los resultados, usando el criterio de hiperplasia del BALT grados 1 y 2, que pueden corresponder a lesiones no sugestivas de NE, y las de hiperplasia del BALT grados 3 y 4 como sugestivas de NE (6).

Dentro de las implicaciones prácticas de este estudio, la observación de las lesiones de hiperplasia del BALT grados 3 y 4 siempre estuvieron claramente acompañadas de otros hallazgos morfológicos que facilitaron el diagnóstico de la neumonía enzoótica. Las lesiones histopatológicas observadas en parte se podrían explicar por la respuesta inflamatoria desencadenada a partir de la presentación del *Mycoplasma hyopneumoniae* por las células presentadoras de antígeno expresándolo como un antígeno del complejo mayor de histocompatibilidad clase II, con respuesta del sistema inmunológico, y la consecuente activación de linfocitos T CD 4+ H1 y H2, por tanto, con estimulación de la inmunidad humoral y de la inmunidad mediada por células, desencadenando infiltrado linfoplasmocitario, reclutamiento severo, activación de macrófagos y consiguiente producción de citoquinas proinflamatorias interleukinas (IL) 1-2-6 y 8 y TNF α principalmente. Paralelamente, el efecto mitogénico producido sobre todo, por proteínas de membrana del *Mycoplasma hyopneumoniae* se expresó morfológicamente en el tejido pulmonar con la hiperplasia del BALT (10).

Los efectos de estas interleukinas sobre el tejido pulmonar se manifiestan con edema, muerte de células epiteliales en los septos alveolares, bronquios y bronquiolos; quimotaxis para monocitos y polimorfonu-

cleares neutrófilos; efectos reforzados mediante metabolitos del ácido araquidónico; citotoxicidad de macrófagos y linfocitos, así como la activación del complemento y la actividad opsonizante de inmunoglobulinas Ig A e Ig G lo cual llevó a la cronicidad del proceso inflamatorio (10, Henderson *et al* 1996 citado por 16).

Estos eventos tienen como resultado un desempeño deficiente del sistema inmunológico frente a otros agentes bacterianos y virales que aprovechan esta condición para complicar y exacerbar los cuadros respiratorios.

Adicionalmente, los resultados de la PCR anidada (con casos positivos del 98,18% del total de muestras evaluadas), sugieren una alta prevalencia de infección por *Mycoplasma hyopneumoniae* en las granjas analizadas. En contraste, los resultados de la investigación sobre cronología e infección por *Mycoplasma hyopneumoniae* en grupos de animales vacunados y no vacunados, mediante serología, PCR anidada, evaluación macroscópica e histopatología, mostraron un promedio de 60% de pulmones con lesiones de hiperplasia del BALT grados 3 y 4 de NE, sin cambios significativos entre los grupos, cuyos resultados de PCR anidada entre 401 muestras fueron del 56,16% al sacrificio (6).

Los resultados del estudio estadístico demostraron una asociación significativa entre la presencia de neutrófilos en vías aéreas, hiperplasia del epitelio respiratorio de bronquios y bronquiolos, y la severa infiltración de vías aéreas por células mononucleares con predominio de macrófagos coincidiendo con lo reportado en estudios preliminares (17, 7).

De otro lado, se debe destacar que en algunos casos se encontraron granulomas en el tejido pulmonar, lo cual permite inferir la presencia de partículas contaminantes en suspensión en el aire. Así mismo, es impor-

tante tener en cuenta la neumonía intersticial presente en muestras de algunas granjas, las cuales podrían corresponder a etiologías de origen viral –virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino PRRSV, circovirus porcino tipo 2 (CVP2), y virus de influenza porcina–, o al mismo *Mycoplasma hyopneumoniae*. Los hallazgos macroscópicos y microscópicos distribuidos heterogéneamente evidencian la transmisión escalonada y la posibilidad de que el desarrollo de las lesiones lleve un ritmo diferente considerando factores como: origen de los cerdos (desde distintas granjas o de una granja de cría), condiciones de manejo (todo adentro todo afuera), densidades poblacionales, rangos de temperatura, calidad de la ventilación, tipo de explotación, edad al destete, edad de las madres, entre otros, así como la situación epidemiológica de las granjas frente al *Mycoplasma hyopneumoniae* (incidencia, densidad de carga bacteriana, inmunidad activa y pasiva), y asociación con otros agentes virales y bacterianos.

CONCLUSIONES

La histopatología como herramienta diagnóstica permite inferir el grado de severidad de las lesiones, evaluar las estructuras afectadas, sugerir por las características de los hallazgos patológicos la posible participación de otras etiologías bacterianas o virales en un mismo caso, e incluso interpretar desde los cambios morfológicos la presencia de partículas inertes en el aire.

La PCR anidada como herramienta complementaria del diagnóstico permitió precisar la presencia del *Mycoplasma hyopneumoniae* en el 98,18% de las muestras evaluadas (54 de 55), y en el 91,7% de las muestras aparentemente sanas (11 de 12) al examen macroscópico.

Las lesiones histológicas del BALT con grados 3 y 4 compatibles con neumonía enzoótica porcina en animales de sacrificio,

junto con el hallazgo del *Mycoplasma hyopneumoniae* en lavados bronquio-alveolares tuvieron un alto índice de concordancia.

Las muestras examinadas presentaron un muy alto grado de concordancia entre la detección del *Mycoplasma hyopneumoniae* por PCR y los hallazgos morfológicos, que no se ha reportado en trabajos similares; sin embargo, no se tuvo en cuenta la situación de población susceptible investigada en aspectos como la historia de enfermedad respiratoria crónica, existencia de planes de vacunación, medicación, persistencia de otros patógenos facilitadores, factores predisponentes, origen de lechones de una o más granjas de reproducción, entre otros.

El examen de porcinos al sacrificio debe hacer parte del plan sanitario de una granja, y del diagnóstico integral de la neumonía enzoótica, pero requiere de pruebas de laboratorio adicionales para correlacionar los resultados. A través de esta metodología se puede establecer parte de la dinámica de los agentes de la NE en los lotes de producción, y es posible tomar medidas profilácticas orientadas hacia el uso de vacunas, administración de antibióticos y corrección en las condiciones de manejo que permitan evitar las pérdidas económicas asociadas a bajos índices de ganancia de peso diario y de conversión alimenticia, originadas en las lesiones pulmonares por neumonía enzoótica y por participación de agentes infecciosos secundarios virales o bacterianos, cuyo mayor impacto se presenta posiblemente 4-6 semanas antes del sacrificio, de acuerdo con estudios cronológicos realizados en donde se encontraron lesiones más severas en este periodo (6).

REFERENCIAS

1. Ross RF. Mycoplasmal diseases. Swine Diseases. Iowa State University Press Cap 36 (495-501); 1999.
2. Pulido A. Evaluación epidemiológica de *Mycoplasma hyopneumoniae* en granjas porcícolas colombianas de producción intensiva aplicando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR-Anidado) y ELISA. Tesis de Maestría, Universidad Nacional ICA, Asociación Colombiana de Porcicultores. Revista Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia 2006; 53 (1).
3. Calsamiglia M, Collins J, Pijoan C. Correlation between the presence of enzootic pneumonia lesions and detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchial swabs by PCR. Veterinary Microbiology 2000; 299-303.
4. Calsamiglia M, Sibila M, Segalés J, Rosell C. Association between *Mycoplasma hyopneumoniae* at different respiratory sites and presence of histopathological lung lesions. Veterinary Record 2004; 155: 57-58.
5. Meyns T, Maes D, Vicca J, Dewulf J, Haesebrouck F, Kruif A. Quantification of the spread of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nursery pigs using transmission experiments. Preventive Medicine Veterinary 2004; 66: 265-275.
6. Sibila M, Nofrarias M, López-Soria S, Segalés J, Valero O, Espinal A, Calsamiglia M. Chronological study of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection, seroconversion and associated lung lesions in vaccinated and non-vaccinated pigs. Veterinary Microbiology 2007; 97-107.
7. Vicca J, et ál. Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. Veterinary Pathology 2003; 97: 177-190.
8. Jensen CS, Ersbøll AK, Nielsen JP. A meta-analysis comparing the effect of vaccines against *Mycoplasma hyopneumoniae* on daily weight gain in pigs. Preventive Veterinary Medicine 2002; 54: 265-278.
9. Rautiainen EJ. *Mycoplasma hyopneumoniae* – Aspects of epidemiology, protection and control. Academic dissertation to be presented with the permission of Faculty of Veterinary Medicine of the University of Helsinki, for public examination in audi-

- torium maximum. University of Helsinki, Finland Faculty of Veterinary Medicine Department of Clinical Veterinary Sciences and National Veterinary and Food Research Institute Seinäjoki Regional Unit on June 20th; 2001.
10. Sarradell J, Andrada M, et ál. A morphologic and immunohistochemical study of the Bronchuss-associated Lymphoid Tissue of Pigs naturally Infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Veterinary Pathology 2003; 40: 395-404.
 11. Baumieister AK, Runge M, Ganter M, Feenstra AA, Delbeck F, Kirchhoff H. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Bronchoalveolar Lavage fluids of pigs by PCR. Journal of Clinical Microbiology 1998; 1984-1988.
 12. Mattsson JG, Bergstro K, Wallgren P, Johansson KE. Detection of *Mycoplasma Hyopneumoniae* in Nose Swabs from Pigs by in Vitro Amplification of the 16s r RNA Gene. Journal Of Clinical Microbiology 1995; 33 (4): 893-897.
 13. Ruiz A, Galina L, Pijoan C. *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization of pigs sired by different boars. The Canadian Journal of Veterinary Research 2002; 66: 79-85.
 14. Dawson B, Trapp R. Bioestadística médica. 4 ed. Editorial Manual Moderno; 2005.
 15. Castro H, Montenegro V. 1992. Caracterización patológica de la Neumonía Enzoótica en porcinos sacrificados en Santa Fe de Bogota. Tesis de grado, Universidad de La Salle.
 16. Vicca J. Virulence and antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates from pigs. Thesis to obtain the academic degree of Doctor of Veterinary Science (Ph. D). Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Department of Reproduction, Obstetrics and Herd Health, Department of Pathology, Bacteriology and Poultry Diseases; 2005.
 17. Rodríguez F, et ál. Immunohistochemical Labelling of Cytokines in Lungs lesions of Pigs Naturally Infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Journal Compendium Pathology 2004; 130: 306-312.