

Cinética de la infección experimental en cerdos con *Mycoplasma hyopneumoniae* usando inmunofluorescencia

Kinetics of *Mycoplasma hyopneumoniae* experimental infection in pigs using immunofluorescence

Tonatiuh Cruz Sánchez*
Jorge L. Tórtora Pérez*
Marco A. Vega**
Andrés Romero Rojas*
Susana E. Mendoza Elvira*
Abel Ciprián Carrasco*

Abstract

Bronchial epithelium from *Mycoplasma hyopneumoniae* experimentally infected pigs was studied by using immunofluorescence. Colonization was analyzed during twenty days post-infection. Twelve one-month-old pigs were intratracheally inoculated with a *Mycoplasma hyopneumoniae*-infected lung homogenate. Pigs were sacrificed on days 1, 4, 8, 12, 16 and 20 post-infection, two each day; six control animals were inoculated with Friis media. Pneumonic lesions were evaluated and analyzed by *M. hyopneumoniae* isolation and histological studies. Direct immunofluorescence was performed to determined colonization. Fluorescence was positive starting on day four; cilium clumping was evident from day eight. *Mycoplasma* installation started in a spot of the bronchial mucosa and extended to form a full fluorescence ring on day 20.

Key words: KINETIC, ENZOOTIC PNEUMONIA, IMMUNOFLUORESCENCE, INFECTION, *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE*, PORCINE.

Resumen

Se observó por medio de inmunofluorescencia el epitelio bronquial de cerdos infectados experimentalmente con *Mycoplasma hyopneumoniae*, el evento de colonización se analizó durante los primeros 20 días posinfección. Doce cerdos de un mes de edad fueron inoculados intratraquealmente con un homogeneizado pulmonar conteniendo *M. hyopneumoniae*. Los cerdos fueron sacrificados de dos en dos, cada uno de los días 1, 4, 8, 12, 16 y 20 posinoculación, así como otros seis animales testigo que fueron inoculados intratraquealmente con medio de Friis. En el sacrificio se evaluaron y se analizaron las extensiones de las lesiones neumónicas y se realizaron estudios histopatológicos y de aislamiento. Se realizó la prueba de inmunofluorescencia directa para determinar la localización del micoplasma. La fluorescencia fue positiva a partir de los cerdos sacrificados el día 4, el fenómeno de agrupamiento de los cilios fue demostrable a partir del día 8. El micoplasma inició la

Recibido el 19 de marzo de 2002 y aceptado el 5 de junio de 2002.

Estudio financiado por el Proyecto PAPIIT núm. IN209701.

* Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Primero de Mayos/n, Campo I, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México, Apartado Postal 222, Cuautitlán Izcalli, Tel/Fax. 56-23-20-58.

** Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Departamento de Patología Experimental, Instituto Politécnico Nacional, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, México, 07360.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Tonatiuh Cruz Sánchez, Laboratorio de Enfermedades Respiratorias del Cerdo, Coordinación General de Estudios de Posgrado e Investigación, Programa de Posgrado en Producción y Salud Animal y Microbiología, FES-Cuautitlán, Av. Primero de Mayo s/n, Campo I, Col. Atlanta, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México, Tel/Fax. (55) 56-23-20-58. Correo electrónico: tonatiuh86@hotmail.com

localización bronquiolar en un punto de la mucosa y se extendió al resto, hasta formar un anillo fluorescente completo al día 20.

Palabras clave: CINÉTICA, NEUMONÍA ENZÓTICA, INMUNOFLUORESCENCIA, INFECCIÓN, *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE*, PORCINOS.

Introduction

Pathogenic mycoplasmas adhere to the surface of epithelial cells in the first stages of the disease. This involves adhesion sites on the mycoplasma cellular membrane and receptors on the host cell.^{1,2} Adherence of *M. hyopneumoniae* in the distal mucosa of the pig's respiratory tract is an important initial event for the development of enzootic pneumonia.^{3,4}

The pathogenicity of mycoplasma depends, to a great extent, on their ability to adhere to the host cell. There is also a close link between cellular adsorption and cytopathogenicity in different species of mycoplasma,^{5,6} a condition that has been pointed out *in vitro* for *M. hyopneumoniae*.^{7,8} Furthermore, it has been observed that when *M. hyopneumoniae* multiplies in the trachea and bronchi, the primary event of infection is the adhesion of the mycoplasma to the ciliated cells, forming clumps, that then unleash the cytopathic effect with epithelial cell exfoliation.^{9,10} A sequential study in pigs inoculated with *M. hyopneumoniae* strain 11, found that in animals sacrificed up to the 12th week of age, fluorescence was very intense up through weeks four to six, and then decreased up to week twelve, thus indicating a decreased number of *M. hyopneumoniae* in the advanced stages of the disease.¹¹ The objective of this study was to demonstrate the initial stages of colonization by *M. hyopneumoniae* in respiratory mucosa using immunofluorescence.

Material and methods

Twenty-one male and female hybrid four-week-old pigs, obtained from a farm that was free of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida* were used. Three pigs were used for the production of the *M. hyopneumoniae*-infected lung homogenate; twelve for the experimental infection and six as controls. The study was conducted following the Animal Care Committee's recommendations. The mycoplasma strain used was *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 194*. Strain culture was carried out in 10 ml of Friis media at 37°C for 72 h. This was then inoculated in

Introducción

Los micoplasmas patógenos se adhieren a la superficie de las células epiteliales en las primeras fases de la enfermedad, esto involucra sitios de adhesión de la membrana celular del micoplasma y receptores de la célula huésped.^{1,2} La adherencia de *M. hyopneumoniae* a la porción distal de la mucosa del tracto respiratorio del cerdo es un evento inicial importante para el desarrollo de la neumonía enzoótica.^{3,4}

La patogenicidad de los micoplasmas depende en gran medida de su habilidad para adherirse a la célula hospedera, además de que existe una asociación estrecha entre la citoadsorción y la citopatogenicidad en diferentes especies de micoplasmas,^{5,6} esta condición se ha señalado *in vitro* para *M. hyopneumoniae*;^{7,8} asimismo, se ha observado que cuando *M. hyopneumoniae* se multiplica en tráquea y en los bronquios, el evento primario de la infección es la adhesión de los micoplasmas a las células ciliadas, formando macollos, que después se desencadena en un efecto citopático con exfoliación de las células epiteliales.^{9,10} En un estudio secuencial de cerdos inoculados con *M. hyopneumoniae* cepa 11, se encontró en los animales sacrificados hasta la semana 12, que la fluorescencia fue muy intensa de la semana cuatro a la seis y que fue decreciendo hasta la semana 12, lo que indicó que hubo una disminución en el número de *M. hyopneumoniae* en los estados avanzados de la enfermedad.¹¹ El propósito de este trabajo fue demostrar con la prueba de inmunofluorescencia, las etapas iniciales de colonización en la mucosa respiratoria por *M. hyopneumoniae*.

Material y métodos

Se emplearon 21 cerdos machos y hembras híbridos, destetados, de cuatro semanas de edad, obtenidos de una granja libre de *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Pasteurella multocida*. Tres cerdos se emplearon para la producción del homogeneizado pulmonar de desafío; doce cerdos para la infección experimental y seis testigos. El estudio fue conducido de acuerdo con la que recomienda el Comité de Cuidado de los Animales. La cepa de micoplasma utilizada en este trabajo fue *Mycoplasma hyopneumoniae* cepa 194.* El cultivo de

* Proporcionada por el doctor Richard Ross, del Veterinary Medical Research Institute, College of Veterinary Medicine, Fowa State University, Ames, Iowa, USA.

250 ml and later 1 000 ml of the same media, incubated at 37°C in a heater bath under constant agitation. Cells were harvested by centrifugation at 16 000 g and then washed three times in Hanks' balanced salt solution (HBSS*). The mycoplasma obtained was stored in sterile vials at -20°C until use in the three pigs for lung homogenate preparation. The preparation and standardization of the *M. hyopneumoniae* inoculate, for the production of lung homogenate, was carried out using the culture containing *M. hyopneumoniae* strain 194 (with 10⁴ color changing units/ml, CCU/ml) in 10 ml of Friis media. This was administered intratracheally to each pig using a nasopharyngeal tube* following sedation with azaperone (2 mg/kg, IM) and anesthetization with metomidate hydrochloride (1.5 mg/kg, IV). The animal was observed daily and as soon as clinical signs, including coughing and dyspnea, appeared was euthanized at 23 days post-inoculation (p.i.). The pneumonic areas were located in the cranial lobules and were separated aseptically for preparation of the lung homogenate at 20% (weight/volume) in 10 ml of Friis media containing *M. hyopneumoniae* at a 10⁴ CCU/ml concentration. This was administered to the other two pigs to obtain more inoculate.¹²

Of the 18 animals, 12 were picked at random and endotracheally inoculated, using a nasopharyngeal tube, with 10 ml of the *M. hyopneumoniae* strain 194 lung homogenate (with a 10⁴ CCU/ml titer). The six control pigs were inoculated with 10 ml of Friis media. All the pigs had been previously sedated and anesthetized. Every four days (days 1, 4, 8, 12, 16 and 20) two inoculated pigs and one control were picked to be sacrificed at random via exsanguination, following sedation and anesthetized. The day on which inoculation occurred was designated as day one. The piglets were observed daily to determine body temperature and evaluate clinical respiratory signs such as coughing and dyspnea.

Lungs were collected aseptically and lesion extension was evaluated using planimetry.¹² Liquid Friis media was used to isolate mycoplasma in sample dilutions ranging from 10⁰ to 10⁻⁵. Cranial lobule sections of pneumonic lung tissue were obtained and frozen using immunofluorescence. Pneumonic lung fragments from all pigs were fixed in paraformaldehyde-lysine-periodate and stained with hematoxylin-eosin for processing and histological evaluation.

Pneumonic lung tissue was collected from various sections and frozen at -70°C. Six micrometer sections were cut with a cryostat microtome and fixed in absolute ethanol at 4°C for 10 min and conserved at -20°C. Staining was carried out using

la cepa fue realizado en 10 ml de medio de Friis, a 37°C, durante 72 h. Posteriormente se inoculó en 250 ml y después en 1 000 ml del mismo medio, incubándose a 37°C en un baño maría por agitación. Las células fueron cosechadas por centrifugación a 16 000g y se lavaron tres veces en solución salina balanceada de Hanks (*HBSS). El micoplasma obtenido fue almacenado en viales estériles a -20°C, hasta su uso en tres cerdos para la preparación del homogeneizado pulmonar. La preparación y estandarización del inóculo de *M. hyopneumoniae* para la producción del homogeneizado pulmonar, se llevó a cabo a partir de un cultivo conteniendo *M. hyopneumoniae* cepa 194 (con 10⁴ unidades cambiantes de color/ml, UCC/ml), en 10 ml de medio de Friis, y fue administrado a un cerdo por vía endotraqueal con una sonda nasofaríngea, el cerdo fue previamente sedado con azaperona (2 mg/kg peso, vía intramuscular) y anestesiado con clorhidrato de metomidato (1.5 mg/kg de peso, vía intravenosa), el animal fue observado diariamente, y cuando se presentaron los signos clínicos de tos y disnea se sacrificó a los 23 días posinoculación (PI). Las áreas neumónicas localizadas en los lóbulos craneales fueron separadas asepticamente y se preparó un homogeneizado pulmonar al 20% (peso/volumen) en 10 ml de medio de Friis con *M. hyopneumoniae* a una concentración de 10⁴ UCC/ml, para ser administrados a los otros dos cerdos y así obtener más inóculo.¹²

De los 18 animales se tomaron al azar 12 cerdos, que fueron inoculados con 10 ml, una suspensión pulmonar de *M. hyopneumoniae*, cepa 194 (con un título de 10⁴ CCU/ml), administrados por vía endotraqueal con una sonda nasofaríngea, a los otros seis cerdos testigos, se les inocularon 10 ml de medio de Friis. Todos los cerdos fueron previamente sedados y anestesiados. Al azar, cada cuatro días (días 1, 4, 8, 12, 16 y 20), se sacrificaron dos cerdos inoculados y un testigo, por exsanguinación, que nuevamente fueron sedados y anestesiados. El día de la inoculación se designó como día uno. Los lechones fueron observados diariamente para determinar la temperatura corporal y evaluar los signos clínicos respiratorios como tos y disnea.

Se obtuvieron los pulmones asépticamente, se evaluó la extensión de las lesiones por el método de planimetría.¹² Se realizó el aislamiento de micoplasmas mediante el empleo del medio de Friis líquido, realizando diluciones de la muestra de 10⁰ a 10⁻⁵. Se tomaron secciones de los lóbulos craneales con tejido pulmonar neumónico y se congelaron para la prueba de inmunofluorescencia. Asimismo, fragmentos de pulmón neumónico de todos los cerdos fueron fijados con paraformaldehído-lisina-peryodato y teñidos con hematoxilina y eosina, para ser procesados y evaluados por histopatología.

Del tejido pulmonar neumónico se tomaron varias secciones y fueron congelados a -70°C. Las secciones

* HBSS, Hanks Balanced Salt Solution, SIGMA BIOSCIENCES Cat H8264.

anti-*M. hyopneumoniae* conjugate in a 1:16 dilution elaborated in the laboratory.¹² The sections were observed in a binocular fluorescence microscope,* using a blue excitation filter (BG12) and a 50 barrier filter. The intensity of the positive reactions was considered to range from 1+ to 4+.¹³

Results

The infected animals showed hyperthermia from day 16, coughing and dyspnea began on day 18. Control pigs did not present clinical signs or fever.

Control animals that were euthanized every four days did not have gross or microscopic lesions. Infected pigs euthanized on day one did not present any gross pulmonary lesions. Lesions began to appear on day four and reached their greatest magnitude at day 20 p.i.. The majority of lesions in animals showed a change in color of the parenchyma, becoming red; likewise, some pigs presented inflammation in mediastinal lymph nodes. The average lesion percentages of consolidated lung were: day one, no lesions; day four, 2.4%; day eight, 7.4%; day 12, 8.1%; day 16, 13.3%; and day 20, 17.2% (Table 1). The histopathologic lesions consisted in perivascular and peribronchial lymphoid hyperplasia, as well as thickening of the alveolar septum, which began on day four, being the most severe in one of the pigs on day 16, and in another on day 20.

The presence of *M. hyopneumoniae* was only detected by immunofluorescence in those animals that had been inoculated. Fluorescence was detected from day 4 p.i., varying from + to +++. The cilium clumping was detected from day eight. By day 20, large fluorescent foci were present both in the mucosa and in the exudates, being most prominent in the bronchioles, forming a characteristic fluorescent ring and presumably involving macrophages that had ingested the desquamated or infected cells (Table 2 and Figure 1). *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates were obtained from all pigs that were inoculated, obtaining dilutions ranging from 10² to 10⁴. In the control pigs, isolation was negative.

Discussion

Immunofluorescence had been evaluated by various authors previously, and had been recommended for diagnostic purposes based upon the advantages that it presents, such as its specificity and speed.^{11,14,15} The specificity of immunofluorescence was determined by Sorensen *et al.*¹⁶ Upon determining the sensitivity of four tests, isolation, immunofluorescence, polymerase chain reaction (PCR) and ELISA, during the acute phase of infection between

fueron cortadas a 6 micrómetros con un microtomo criostato y fijadas en etanol absoluto a 4°C durante diez minutos y conservadas a -20°C. La tinción fue realizada con conjugado contra *M. hyopneumoniae*, una dilución 1:16, elaborado en el laboratorio.¹² Posteriormente se observaron en un microscopio de fluorescencia binocular*, utilizando un filtro de excitación azul (BG12) y un filtro de barrera 50. La intensidad de las reacciones positivas fue considerada de 1+ a 4+.¹³

Resultados

En los animales desafiados se observó la hipertermia a partir del día 16, mientras que los signos clínicos de tos y disnea se presentaron a partir del día 18. Los cerdos testigos no presentaron signos clínicos ni temperatura.

En los animales testigos que fueron sacrificados cada cuatro días no se encontraron lesiones macroscópicas ni microscópicas. En los cerdos desafiados y sacrificados a partir del día uno no se presentaron lesiones pulmonares macroscópicas. Se empezaron a observar lesiones en los pulmones en los animales sacrificados a partir del día cuatro y alcanzaron su mayor magnitud al día 20 posinoculación. El aspecto de las lesiones en la mayoría de los animales fue el cambio de color del parénquima a coloración rojiza; asimismo, algunos cerdos presentaron inflamación de linfonodos mediastínicos. Los promedios de los porcentajes de lesión del área pulmonar consolidada fueron en el día uno: sin lesiones; día cuatro: 2.4%, día ocho: 7.4%, día doce: 8.1%, día dieciséis: 13.3% y día veinte: 17.2% (Cuadro 1). Las lesiones histopatológicas consistieron en una hiperplasia linfocítica perivascular y peribronquial y engrosamiento del septo alveolar, la cual inició a partir del día cuatro, siendo el cuadro más severo en uno de los cerdos del día 16 y en otro en el día 20.

Se detectó la presencia de *M. hyopneumoniae* por medio de la prueba de inmunofluorescencia* sólo en los animales inoculados. La fluorescencia fue detectada a partir del día 4 PI, esta fluorescencia varió de + a +++; asimismo, el fenómeno de agrupamiento de los cilios fue detectado a partir del día 8. En el día 20 se observaron grandes focos fluorescentes, tanto en mucosa como en el exudado que ocupó especialmente a los bronquiolos, formándose un anillo fluorescente característico y presumiblemente macrófagos que han ingerido células descamadas e infectadas (Cuadro 2 y Figura 1). En todos los cerdos inoculados se logró recuperar a *Mycoplasma hyopneumoniae*, en diluciones que variaron de 10² a 10⁴. En los cerdos testigos el aislamiento fue negativo.

Discusión

La prueba de inmunofluorescencia fue previamente evaluada por varios autores, recomendándola por las ventajas

* Carl Zeiss, WL equipado con condensador de campo oscuro y lámpara de vapor de mercurio HB 22 W/4.

Cuadro 1

EVALUACIÓN *post mortem* EN LOS CERDOS TESTIGO Y DESAFIADOS EXPERIMENTALMENTE CON *Mycoplasma hyopneumoniae* DESDE EL DÍA 1 HASTA EL DÍA 20*Post mortem* EVALUATION OF CONTROL PIGS AND THOSE EXPOSED TO *Mycoplasma hyopneumoniae* FROM DAY 1 TO 20.

	Days					
	1	4	8	12	16	20
Pigs inoculated	2	2	2	2	2	2
PLE	0	24	74	8.1	13.3	17.2
ML	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
Culture	Neg	10 ³	10 ³	10 ³	10 ⁴	10 ⁴

Six control pigs were inoculated with 10 ml of Friis media, one was sacrificed on each day shown, all were negative to all tests. Twelve pigs were inoculated with 10 ml of lung homogenate containing 10⁴ CCU/ml of *M. hyopneumoniae*, sacrificing two on each day shown. PLE: Pneumonic lesion extent in %; ML: microscopic lesions with peribronchiolar lymphocytic infiltration, characteristic of proliferative pneumonia. Culture: *M. hyopneumoniae* isolation from pneumonic lesions found in the cranial lobules. Neg: negative, Pos: positive.

days 14 and 28 p.i., culture was the most sensitive method when compared against immunofluorescence, while PCR or immunoenzymatic assay was best at detecting antigen; while immunofluorescence was comparable to PCR.

In all pigs inoculated, mycoplasma was recovered and positive fluorescence was observed in the bronchioles, thus confirming that the animals had been infected. From day eight, clumping was observed, with the cilia forming tufts, attributed to the sticky mycoplasmal surface which agglomerated them, thus allowing cilia to stick to one another; said phenomenon was observable in all the inoculated animals.^{10,17} Mycoplasma continued to invade the bronchiolar mucosa and fluorescence was more abundant, thus indicating an increase in the number of mycoplasma. Previous studies^{16,18} have used immunofluorescence as part of their experimental work. In this study, sequential euthanasia permitted us to define how the mycoplasma initiated infection and was present only on a small portion of the bronchiolar mucosa (days four and eight p.i.), later advancing along the entire mucosa up to day 16 where a fluorescent ring was formed.

On day 12, both fluorescence and cilium clumping were detectable. Bronchiolar epithelial hypertrophy was more evident and the lung tissue began to consolidate. At this point, bronchiolar epithelium ceased to be the main removal mechanism and colonization by secondary pathogens, in particular *Pasteurella multocida*, occurred, as has been pointed out by other authors.^{12,19}

On day 16 fluorescence intensity became greater, the quantity of mycoplasma antigen increased

que presenta, como en su rapidez de realización y especificidad, para su empleo en el diagnóstico.^{11,14,15} La especificidad de la prueba de inmunofluorescencia fue determinada por Sorensen *et al.*¹⁶ Al determinar la sensibilidad de cuatro pruebas, aislamiento, inmunofluorescencia, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y ELISA durante la fase aguda de la infección entre los 14 y 28 días posinfección, el cultivo fue el método más sensible en comparación con la inmunofluorescencia, la PCR o un ensayo inmunoenzimático para detectar el antígeno, la prueba de inmunofluorescencia resultó comparable a la PCR.

En todos los cerdos inoculados se recuperó el micoplasma y se observó fluorescencia positiva en los bronquiolos, lo cual confirmó que los animales estaban infectados. A partir del día ocho, ocurrió el fenómeno de agrupamiento, en el cual los cilios se unieron formando mechones, y se atribuyó a la superficie pegajosa del micoplasma que los aglomeró, permitiendo que los cilios se pegaran entre sí, el fenómeno fue perceptible en todos los animales inoculados.^{10,17} El micoplasma continuó invadiendo la mucosa bronquiolar, y la fluorescencia se observó más abundante, ello significó que el número de micoplasmas aumentó. En trabajos previos^{16,18} se ha utilizado la prueba de inmunofluorescencia como parte de los trabajos experimentales, en este trabajo por la forma secuencial y en la etapa inicial en que fueron sacrificándose los animales, se pudo definir cómo el micoplasma inició la infección y cómo fue localizado en una pequeña porción de la mucosa bronquiolar (días 4 y 8 PI), para posteriormente avanzar sobre toda la mucosa, hasta el día 16 se formó un anillo fluorescente.

En el día 12 se detectaron la fluorescencia, así como el apelmazamiento de los cilios. La hipertrofia del epitelio bronquiolar fue más acentuada, y el tejido pulmonar comenzó a consolidarse. En estas condiciones el epitelio bronquiolar dejó de ser el principal mecanismo de re-



Cuadro 2

GRADOS DE FLUORESCENCIA Y EFECTO DE APELMAZAMIENTO EN LOS CERDOS INFECTADOS CON *Mycoplasma hyopneumoniae*
FLUORESCENCE DEGREE AND EFFECT OF CILIUM CLUMPING IN PIGS INFECTED WITH *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Day	Control pigs	IFA	Infected pigs	IFA degree	Cilium clumping
0	1	-	2	-	-
			3	-	-
4	4	-	5	+	-
			6	-	-
8	7	-	8	+	-
			9	+	+
12	10	-	11	++	+
			12	++	+
16	13	-	14	+	+
			15	+++	+
20	16	-	17	+	+
			18	++	+

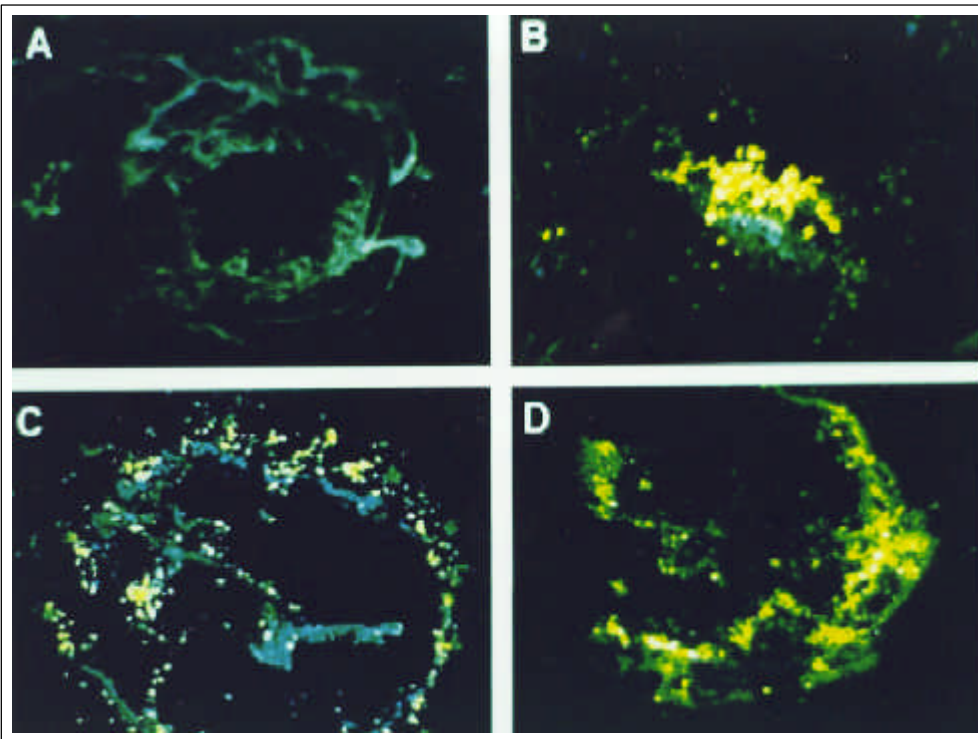


Figura 1. Prueba de inmunofluorescencia. Observación de focos fluorescentes en cortes de pulmón infectados con *Mycoplasma hyopneumoniae* de animales infectados y sacrificados en diferentes días posinfección. Día cero, sin focos fluorescentes; día ocho, focos fluorescentes pequeños situados en un área de los bronquiolos; día doce, focos fluorescentes en toda la mucosa bronquial del tejido afectado y en la luz células descamadas y quizás macrófagos que las han ingerido; día veinte, grandes focos fluorescentes tanto en mucosa como en el exudado que llena los bronquiolos presumiblemente macrófagos que han ingerido células descamadas e infectadas (400X).

Immunofluorescence test. Focal fluorescence in lung sections from pigs infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* and euthanized on different days post-infection. Day zero, no focal fluorescence; day eight, small focal fluorescence spots in bronchiolar area; day 12, focal fluorescence in all the bronchial mucosa of the affected tissue, as well as in the desquamated cells found in the lumen and possibly in macrophages that have ingested the cells; day 20, large focal fluorescence spots in the mucosa as well as in the exudate that fill the bronchioles, presumably in macrophages that have ingested desquamated and infected cells (400X).



and the test became all the more evident, thus forming the complete fluorescence ring (Table 2 and Figure 1). This is different to what was found by Amanfu *et al.*,¹¹ who determined fluorescence every two weeks, finding the most intense reaction during weeks four and six, with decreasing amounts up to week 12, thus indicating the decreased number of *M. hyopneumoniae* in the advanced stages of the disease.

Day eight marked the start of cilium clumping, concurrent with proliferation of bronchial associated lymphoid tissue (BALT) and other cellular elements. It is worthy to note the existence of fluorescent foci outside the mucosa (Figure 1B), which could indicate certain transport by macrophages and dendritic cells to nearby lymphoid tissue which could unleash a humoral or cellular immune response. It is possible that from this day mycoplasma exerts a double action, first in the destruction of cilia and then liberating proteins and toxins that initiate the modulation of the cellular response. These findings on cilium clumping in the early stages of the disease concur with studies by Blanchard *et al.*⁷ and Mebus and Underhal,⁵ and it would be interesting to determine the behavior of mycoplasma within lung tissue, as well as the role of immunomodulating factors in the immunopathogenicity of *M. hyopneumoniae*.

Acknowledgements

For their technical assistance the authors wish to thank: Dr. Eliseo Hernández B., M.C. Germán Colmenares V., Q.F.B. Claudia León, M.C. Edgar Aguilera Cerón, as well as M.V.Z. David Trujillo for his technical assistance and helpful information, and, finally, Dr. Leopoldo Flores R. for his comments concerning the study.

Referencias

1. Simecka WJ, Davis KJ, Davidson KM, Ross ES, Stadtlander HKC, Casell HG. Mycoplasma diseases of animals. In: Maniloff J, editor. Mycoplasmas, molecular biology and pathogenesis. Washington (D.C): American Society for Microbiology, 1992:391-416.
2. Thacker LE. Disease mechanisms: an overview: How microbes cause disease. Proceedings of the 15th International Pig Veterinary Society Congress; 1998 July 5-9; Birmingham, England. Nottingham University Press, 1998; 95-101.
3. Christensen G, Sorensen V, Mousing J. Diseases of the respiratory system. In: Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ, editors. Diseases of swine. 8th Ed. Ames (Io). State University Press, 1999:913-940.

moción pulmonar y la colonización por patógenos secundarios, en particular *Pasteurella multocida*, se llevó a cabo como lo han señalado otros autores.^{12,19}

En los cerdos del día 16 se incrementó la intensidad de la fluorescencia, la cantidad de antígeno de micoplasmas fue alta y la prueba se hizo más evidente; se observó la formación de un anillo fluorescente completo (Cuadro 2 y Figura 1), a diferencia de Amanfu *et al.*,¹¹ quienes lo determinaron cada dos semanas, en donde la fluorescencia fue muy intensa durante la semana cuatro a seis, y fue decreciendo hasta la semana 12, lo que indicó que hubo disminución en el número de *M. hyopneumoniae* en los estados avanzados de la enfermedad.

El día ocho marcó el inicio del agrupamiento de los cilios y a la vez se observó la proliferación del tejido linfoide asociado a bronquios (BALT) y otros elementos celulares. Es de llamar la atención la existencia puntos fluorescentes fuera de la mucosa (Figura 1), lo que podría indicar un acarreo por parte de macrófagos o células dendríticas al tejido linfoide más cercano, lo cual desencadenaría una respuesta humoral o celular. Es posible que a partir de este día, el micoplasma ejerza una doble acción, primero en la destrucción de los cilios y la otra liberando proteínas o toxinas que inicien la modulación de la respuesta celular; estos hallazgos de agrupamiento en los primeros estadios de la enfermedad coinciden con los trabajos de Blanchard *et al.*⁷ y Mebus y Underhal,⁵ por lo que sería interesante establecer el comportamiento que realiza el micoplasma dentro del tejido pulmonar, así como la estimulación de factores inmunomoduladores como parte de los eventos inmunopatógenos de *M. hyopneumoniae*.

Agradecimientos

Se agradece la asistencia técnica de: Dr. Eliseo Hernández B., M.C. Germán Colmenares V., Q.F.B. Claudia León, M.C. Edgar Aguilera Cerón, así como al MVZ David Trujillo por su asistencia técnica-informática y al Dr. Leopoldo Flores R. por sus comentarios al estudio.

4. Desrosiers R. Control of bacterial respiratory diseases. Proceedings of the 15th International Pig Veterinary Society Congress; 1998 July 5-9; Birmingham, England. Nottingham University Press, 1998:21.
5. Mebus CA, Underhal NR. Scanning electron microscopy of trachea and bronchi from pigs inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Am J Vet Res 1977;38:1249-1255.
6. Mc Garrity JG, Kotani H, Butler HG. Mycoplasmas and tissue culture cells. In: Maniloff J, editor. Mycoplasmas, molecular biology and pathogenesis. Washington (DC): American Society for Microbiology, 1992:445-456.
7. Blanchard B, Vena MM, Cavalier A, Le Lannie J, Gouraton J, Kobish M. Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet Microbiol 1992;30:329-341.

8. Zielinski GC, Ross RF. Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine ciliated respiratory tract cells. *Am J Vet Res* 1993;54:1262-1269.
9. Williams PP, Gallagher JE. Cytopathogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal ring and lung explant organ cultures alone and in combination with monolayer cultures of fetal lung fibroblast. *Infect Immun* 1978;20:495-502.
10. González RN, Cruz ST, Mendoza ES, Hernández-Baumgarten E, Colmenares VG, Romero RA, Tórtora PJ, Ciprián CA. Evidencia por microscopia electrónica de barrido del daño al epitelio mucociliar producido por la interacción entre *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Pasteurella multocida* en el pulmón del cerdo. *Téc Pecu Méx* 1999;37:31-42.
11. Amanfu W, Weng CN, Ross RF, Barnes HJ. Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* of swine: sequential study by direct immunofluorescence. *Am J Vet Res* 1984;45:1349-1352
12. Ciprian A, Pijoan C, Cruz T, Camacho J, Tortora J, Colmenares G, et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. *Can J Vet Res* 1988;52:434-458.
13. Sánchez-Vizcaíno JM. Manual de laboratorio de Inmunología. Madrid, España Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias de Sanidad Animal, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Departamento de Sanidad Animal. 1990.
14. Erno H. Mycoplasmas use of polyvalent antisera for identification by indirect immunofluorescence. *Acta Vet Scand* 1977;18:176-186.
15. Giger T, Bruggman S, Nicolet J. Immunological methods for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in frozen sections and bronchial smears. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1977;119:125-134.
16. Sorensen V, Barfod K, Ahrens P, Friis NF, Feenstra AA, Pedersen MW, et al. Comparison of four different methods for demonstration of *Mycoplasma hyopneumoniae* in lungs of experimentally inoculated pigs. Proceedings of the 13th International Pig Veterinary Society Congress; 1994 June 26-30; Bangkok, Thailand. Chulalongkorn University Faculty of Veterinary Science, 1994:188.
17. Hsu T, Minion FC. Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. *Infect Immun* 1998;64:4762-4766.
18. Ross RF. Mycoplasmal diseases. In: Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ. editors. Diseases of swine. 8th ed. Ames (Io): Iowa State University Press, 1999:495-509.
19. Amass SF, Clark LK, Van Alstine WG, Bowersock TL, Murphy DA, Knox KE, et al. Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida* infections in swine. *J Am Vet Med Assoc* 1994;204:102-107.