

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



V519

**DIAGNOSTICO MICROSCOPICO PRESUNTIVO DE AGENTES  
INFECCIOSOS PRESENTES EN EXUDADOS PULMONARES DE  
CERDOS MEDIANTE DIFERENTES TECNICAS DE TINCION.**

**TESIS PROFESIONAL**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

**PRESENTA:**

**WALDINA PATRICIA REYES VELAZQUEZ**

**GUADALAJARA, JALISCO, 1985**

DEDICATORIAS

A la persona más buena del mundo  
a quien me dió la vida  
y a la que debo todo lo que soy  
A mi Madre:  
MARIA TERESA VELAZQUEZ VERA.

A mis Hermanas:  
MARIA TERESA Y MARCELA  
Con mucho cariño.

A mis sobrinos:  
SUSANA Y JESUS ALBERTO  
A quienes quiero mucho.

**A mis Asesores:**

M.C. M. en C. Luis Gustavo Villa Manzanares.

M.V.Z. M. en C. Joaquín García Estrada.

Con especial cariño y admiración por su  
invaluable colaboración en la realización  
del presente trabajo.

**A mi H. Jurado:**

M.V.Z. Guifre Muria I. Rourét.

M.V.Z. Ricardo García Lozano.

M.V.Z. Luis Enrique Espinoza Paez.

M.V.Z. Luis Ramón Ortiz Berriel.

Q.F.B. Yolanda Partida Ortiz.

Con respeto y cariño.

Al personal de los  
Departamentos de Bacteriología  
y Bioquímica de esta Facultad.

A mis Amigos y Compañeros:

Graciela Leal Isla, Silvia Rubalcaba,  
Adriana Nathal, Antonio Rostro, Luis  
Fernando Crozco, Alejandro Arvizu, José  
Gpe. Benitez, Arturo Soto, Jesús Cortés,  
y Salvador Amezcua.

De quienes guardo un bonito recuerdo.

A todas las personas que de alguna  
manera colaboraron en la realización  
de la presente Tesis.

# I N D I C E

|                                      | Página |
|--------------------------------------|--------|
| I. INTRODUCCION .....                | 2      |
| II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA ..... | 16     |
| III. HIPOTESIS .....                 | 17     |
| IV. OBJETIVOS .....                  | 18     |
| V. MATERIAL Y METODOS .....          | 19     |
| VI. RESULTADOS .....                 | 22     |
| VII. DISCUSION .....                 | 39     |
| VIII. CONCLUSIONES .....             | 46     |
| IX. RESUMEN .....                    | 47     |
| X. BIBLIOGRAFIA .....                | 48     |

## A B R E V I A T U R A S

B.A.A.R. = BACILOS ALCOHOL ACIDO RESISTENTES.

$\mu\text{m}$  = MICROMETROS.

mm = MILIMETROS

P.A.S. = AC. PERIODICO DE SCHIFF.

PMN = POLIMORFONUCLEARES.

$\bar{X}$  = MEDIA.

S = DESVIACION ESTANDARD

$S\bar{X}$  = ERROR ESTANDARD.

$\Sigma$  = SUMATORIA.

## I N T R O D U C C I O N

Las enfermedades respiratorias son muy frecuentes en cerdos , el mayor porcentaje está representado por las neumonías, que abarcan del 40 al 50 %. Algunas veces estos trastornos no solo son responsables de la muerte de los animales, sino que con frecuencia producen disminución severa en el desarrollo y rendimiento en peso de los animales que son destinados al sacrificio a una edad promedio de 6 meses (15,20,23)

Las patologías pulmonares que presentan como característica un tipo de inflamación exudativa se denominan neumonías exudativas, estas se clasifican como: bronconeumonía y neumonía fibrinógena, ambas se adquieren principalmente por vía aérea. Otro tipo de neumonías generalmente de diseminación hematógena se clasifican como intersticiales, granulomas, embólicas y de asociación mixta (13) .

Además de la presencia de exudados, la clasificación macroscópica de las neumonías se basa en la apariencia externa e interna del pulmón, tal como, color, localización anatómica y extensión de la lesión. Esta distinción es arbitraria ya que las neumonías exudativas en sus diferentes tipos y periodos de evolución representan la continuación de una reacción inflamatoria única, sin embargo se utilizan con frecuencia porque permiten definir el tipo de exudado y las posibles causas que lo producen (16) .

Actualmente existen diferentes técnicas de diagnóstico para definir los factores etiológicos responsables de las neumonías, entre los principales se encuentran:

### A. Estudios Anatomopatológicos:

Se basan en el aspecto de las lesiones macroscópicas y no pueden ser determinantes, por la similitud de las alteraciones como respuesta al efecto de diferentes agentes patógenos.

#### B. Estudios Histopatológicos:

Consisten en el análisis microscópico a nivel tisular mediante el cual es posible observar las alteraciones celulares que pueden ser indicativas de un diagnóstico presuntivo. Entre algunas de las características anormales están el engrosamiento de las paredes alveolares, destrucción y necrosis y en ocasiones obstrucción de luz alveolar por bacterias mononucleares, polimorfonucleares y material exudativo(9,22)

A pesar de la información que proporciona este procedimiento, la limitante mayor es la falta de laboratorios de Histopatología en la mayoría de las zonas pecuarias, además de la inespecificidad de muchas de las respuestas celulares que se observan.

#### C. Exámenes Bacteriológicos:

Son técnicas de diagnóstico que permiten el aislamiento y tipificación de las bacterias responsables de las alteraciones en los pulmones. Una vez que el microorganismo ha sido aislado mediante el cultivo selectivo del mismo, se le identifica por sus características morfológicas coloniales, velocidad de desarrollo y propiedades bioquímicas, inmunogénicas y patológicas cuando se inocular a tejidos vivos (4) .

Estas técnicas representan un método diagnóstico muy preciso, sin embargo requieren de equipo y material costoso además de un período largo para la obtención de resultados.

#### D. Pruebas Serológicas:

Son procedimientos de laboratorio mediante los cuales se obtienen datos de presunción de la enfermedad. Las pruebas serológicas más utilizadas en Medicina Veterinaria son: aglutinación en tubo y placa, inmunodifusión, contrainmunolectroforésis y fijación de complemento (4). Estas técnicas son poco utilizadas ya que no existen antígenos disponibles de fabricación nacional, ni laboratorios especializados que las realicen.

#### E. INMUNOFLUORESCENCIA:

Es un método histoquímico sumamente específico, debido a que la tinción inmunofluorescente refleja la especificidad serológica del anticuerpo empleado. Las limitaciones son iguales que para las pruebas serológicas (11) .

#### F. Estudios de Larvoscopia: (Técnica de Baerman).

Esta técnica es específica para revelar el crecimiento larvario, con ella es posible identificar larvas pulmonares particularmente Metastrongylus, que son agentes causales de neumonías parasitarias. Su metodología es sencilla, aunque la precisión diagnóstica es pobre ya que solo permite identificar el origen parasitario del problema pulmonar que en pocos casos se presenta aislado (1) .

Como puede inferirse con base a la información anteriormente presentada, no es posible establecer un diagnóstico definitivo mediante el uso de uno solo de estos procedimientos, ya que las neumonías comúnmente se producen por diferentes causas, en este fenómeno los microorganismos actúan de una forma mixta y secuencial (3,27). Los agentes causales más frecuentes que se conocen en neumonía porcina infecciosa se esquematizan en el cuadro N° 1 .

Entre las neumonías de mayor importancia, tanto primarias como secundarias se encuentran:

1. PLEUROPNEUMONIA PORCINA.- Se presenta con frecuencia en la producción porcina intensiva, es producida por Haemophilus pleuropneumoniae, y se caracteriza por dificultad respiratoria diafragmática, posición de "perro sentado" con la boca abierta, cianosis de las orejas y extremidades, tos breve y muerte con hemorragia nasal dentro de los primeros cuatro días de inicio del padecimiento, o bien puede ocurrir recuperación espontánea.

La mayoría de los brotes observados han sido en animales de 30 a 50 Kilos, se ha reportado hasta el 80 % de morbilidad y un 35 % de mortalidad, mismas que aumentan cuando no se aplica tratamiento adecuado (6) .

Las lesiones macroscópicas postmortem detectadas en los estudios realizados en México son: pericarditis, hidropericardio, hidrotórax, adherencias pleurales (viscerales y parietales), infarto rojo en los lóbulos diafragmáticos y friabilidad de la zona infartada. Microscópicamente se observan zonas de infarto, edema alveolar, infiltración peribronquial y perivascular de células mononucleares (linfocitos y macrófagos) y hemorragias alveolares (24,26) .

2. PASTEURELOSIS.- Enfermedad producida por Pasteurella multocida, bacteria de baja virulencia que requiere de factores externos, tales como la combinación de humedad y frío, algunas virosis y micoplasmas principalmente para desencadenar la enfermedad, esta se caracteriza por afectar animales de engorda (8 a 10 semanas) aunque puede afectar animales mayores, ya que alrededor de un 15 % de los animales que se sacrifican presentan lesiones características como consolidación pulmonar rojo-grisácea, con mayor tendencia al color gris, lo que diferencia este padecimiento de Micoplasmosis, además de la presencia de adherencias y exudado mucopurulento (14) .

A nivel histopatológico se observa bronconeumonía lobular de tipo exudativo e infiltración peribronquial de mononucleares, cuando la enfermedad progresa se observan abundantes neutrófilos, células mononucleares y exudado mucopurulento en alveolos y bronquiolos (24) .

3. NEUMONIA ENZOOTICA.- Es un padecimiento que se presenta después de que ocurrieron problemas agudos, se supone como agente causal a Mycoplasma hyopneumoniae, sin embargo estudios recientes han demostrado que este trastorno es'

de origen multifactorial, al parecer los micoplasmas actúan como agentes primarios desencadenantes del proceso o bien como mediadores entre la infección viral y la asociación bacteriana secundaria (24). De estas bacterias oportunistas Pasteurella multocida produce las lesiones de mayor severidad. Entre las principales lesiones está la consolidación de lóbulos pulmonares anteriores que aparecen de color rojo intenso, además de infiltración linfocitaria peribronquial.

Al examen clínico se observa una respiración forzada y estornudos cuando se ejercita el animal, en la mayoría de los casos la enfermedad persiste en forma crónica subclínica y solo es detectada a nivel de rastro (21, 25) .

#### 4. ESTREPTOCOCOSIS.- (Streptococcus zooepidemicus)

La disminución de las defensas inmunológicas del huésped predispone a la disminución patológica de los estreptococos, éstos producen abscesos locales o bien pasan a la circulación sanguínea sistémica, por lo que se produce una septicemia que se acompaña en ocasiones de neumonías donde participan principalmente Pasteurellas, estas evolucionan a procesos supurativos, además de otras afecciones no neumónicas (24) .

5. TUBERCULOSIS.- Su frecuencia es mayor en temperaturas y climas fríos, generalmente los signos son imprecisos lo que dificulta el reconocimiento de la enfermedad. Los síntomas son semejantes a los de una enfermedad crónica entre los principales están la tos, que puede ser inicialmente áspera y seca, tornándose suave y húmeda cuando progresa el padecimiento, en la auscultación se perciben fuertes sonidos vesiculares, los ganglios linfáticos retrofaríngeos, submaxilares, precurales y supraxilares aumentan de tamaño. Cuando el Mycobacterium es de tipo aviar puede causar aborto, los signos intestina

les son diarrea, emaciación y presencia de abscesos en hígado. En los animales que presentan signos nerviosos se puede observar paresia, hiperestesia e hipersensibilidad motora (17). Cuando los bacilos tuberculosos crecen en un tejido son fagocitados por los macrófagos, sin que sean afectados por las enzimas del sistema lisosomal citoplásmico por lo que permanecen intactos en el interior de la célula. Las células mononucleares presentan un quimiotactismo positivo hacia los bacilos, por lo que se forma una masa microscópica, ésta induce la proliferación periférica de fibroblastos y causa necrosis central de tipo caseoso en el parénquima pulmonar como resultado de una respuesta alérgica, posteriormente este material necrótico se condensa en un tubérculo (29) .

6. INFLUENZA PORCINA.- Es una enfermedad aguda de etiología viral (Influenzavirus). La infección se inicia con descamación intensa del epitelio respiratorio, lo que causa pérdida del epitelio ciliado y hemorragias difusas. Como resultado de lo anterior disminuyen las defensas del aparato respiratorio, con la consecuente invasión de una gran variedad de agentes secundarios y oportunistas (31).

Los principales signos clínicos son: fiebre, respiración superficial entrecortada, tos paroxística, ojos y ollares con abundante exudado y moco, la recuperación es tan rápida y espectacular como las manifestaciones de la patología misma. Las lesiones macroscópicas no revelan información cuando no están asociadas con bacterias. Las áreas más afectadas muestran enfisema y edema interlobulillar, los ganglios mediastínicos se encuentran aumentados de tamaño y en ocasiones hiperémicos.

Las lesiones microscópicas permiten identificar una neumonía exudativa con predominio de PMN y cantidades moderadas de linfocitos. Se observan células epiteliales de descamación con vacuolización intracitoplásmica, sobre

todo a nivel de bronquiolos y existe además una marcada infiltración peribronquial de mononucleares sin que se observen cuerpos de inclusión en las células afectadas' (18,24) .

7. METASTRONGILOSIS.- Se hace evidente por una bronquitis verminosa de cerdos que se crían en piso de tierra. -- Etiología: Metastrongylus apri, M. pudendotectus y M. salmi. Pueden aparecer 10 días después de la infección signos de alteración digestiva tales como: emisión de heces blandas y diarreas de coloración negruzca, los -- síntomas respiratorios más comunes son tos ronca y espasmódica, que favorece la eliminación de moco, este exudado catarral se torna mucopurulento cuando progresa' la enfermedad (10) .

Al examen hematológico se observa eosinofilia al --- principio de la enfermedad, ésta disminuye rápidamente' a niveles mínimos al cabo de unas semanas, las lesiones se encuentran principalmente en el borde ventral de los lóbulos diafragmáticos y se invade la zona dorsal en infecciones masivas. En cortes histológicos los bronquios se encuentran obstruidos de moco y vermes. los alveolos dilatados y la pared rodeada de un infiltrado de células mononucleares y eosinófilos. Los nódulos pseudo tuberculosos y gránulos de pequeña dimensión (1 mm) son ricos en eosinófilos. Al cortar esta área se observa lisa o finamente granulada y a la presión se libera líquido con las características de edema o exudado mucopurulento.

La evolución es lenta y crónica, generalmente no altera el estado general normal del animal excepto en infecciones masivas. Sin embargo la larva es importante' como vector mecánico en el transporte del virus de la Influenza, enfermedad de Teschen, peste porcina africana, además de algunas bacterias como Pasteurella multocida.

Cida, H. parahaemolyticus y E. coli (28) .

- 8. AUJESKY Y COLERA PORCINO.- Ambas enfermedades producen alteraciones respiratorias, sin embargo se diferencian por presentar un conjunto de síntomas clínicos asociados característicos de la enfermedad (24) .

ENFERMEDADES NO INFECCIOSAS

Este grupo está representado principalmente por intoxicaciones, manifestaciones de hipersensibilidad o por afecciones de carácter muy crónico como algunas micosis profundas:

1. Intoxicaciones por nitritos y nitratos.- se asocian con cama de paja muy húmeda y en estado de fermentación, así como en zahúrdas muy cerradas, en ambos casos el nitrito se concentra en aguas de condensación o en los desagües, en estos casos se observa enfisema pulmonar además de que la canal adquiere un color parduzco, por la concentración aumentada de la metahemoglobina.

2. Procesos de hipersensibilidad por inhalación de esporas de varios hongos, especialmente presentes en el alimento húmedo y enmohecido. El cuadro clínico que se observa es muy variable, solo es posible detectar tos seca y según el tipo de hipersensibilidad, se puede encontrar en el estudio histopatológico contracción bronquial (tipo I, clasificación inmunológica de Gell y Coombs), edema y hemorragia (tipo III) o infiltración linfocitaria peribronquial (tipo IV)(11) .

Con el objeto de poder establecer una comparación precisa entre las principales patologías que afectan los pulmones se diseñó el cuadro Nº 2 que presenta las características principales de cada enfermedad.

Debido a la naturaleza tan variada de los agentes -- que producen neumonías, la identificación del factor etiológico responsable de la patología es de suma importancia para la elección de medidas profilácticas y terapéuticas. Los procedimientos de diagnóstico inicialmente descritos son de gran utilidad, sin embargo una de las limitantes principales es la necesidad de contar con un equipo de laboratorio especializado y reactivos de difícil adquisición, además -- del tiempo que transcurre para obtener resultados definitivos. Lo anterior hace evidente la necesidad de disponer de métodos de diagnóstico más rápidos y fáciles de desarrollar que proporcionen información confiable.

Entre los procedimientos que presentan las cualidades anteriores y que han demostrado utilidad para auxiliar al establecimiento de un diagnóstico, principalmente en -- trastornos neumónicos, se encuentran los métodos de tinción en frotis.

Estos métodos tintoriales nos permiten observar las características del material exudativo así como algunos de los microorganismos presentes en éste, por lo que es posible establecer una correlación directa entre la presencia presuntiva de un agente patógeno y la respuesta tisular que se produce. Las alteraciones pueden ser descritas mediante la aplicación de criterios anatomopatológicos ampliamente reconocidos e inicialmente descritos.

La rapidez en el diagnóstico es importante debido a que actualmente los problemas respiratorios producen un impacto económico adverso ya que se afecta el rendimiento de la canal, la eficiencia de conversión alimenticia (5 % de retraso de la ganancia diaria por cada 10 % de pulmón afectado), además de un retardo en los días de engorda (32) .

En conclusión la importancia económica de las neumonías hace necesario el contar con métodos diagnósticos más precisos que permitan seleccionar las mejores alternativas

terapéuticas y de manejo, ya que en la actualidad uno de -- los procedimientos más utilizados por los Médicos Veterinarios es el diagnóstico clínico propedéutico, que comúnmente no se complementa con otros procedimientos, con los recur-- sos auxiliares mencionados puede llegar a ser un método más preciso. Con el propósito de expresar más ampliamente lo - anterior se ha diseñado un diagrama de flujo (cuadro Nº 3) que permite plantear la estrategia diagnóstica mediante una secuencia iterativa que da cierto grado de confianza para ' el diagnóstico.

Cuadro No. 1.- Microorganismos causantes de neumonía porcina mas comunes en las explotaciones porcinas mexicanas.

## AGENTES INFECCIOSOS

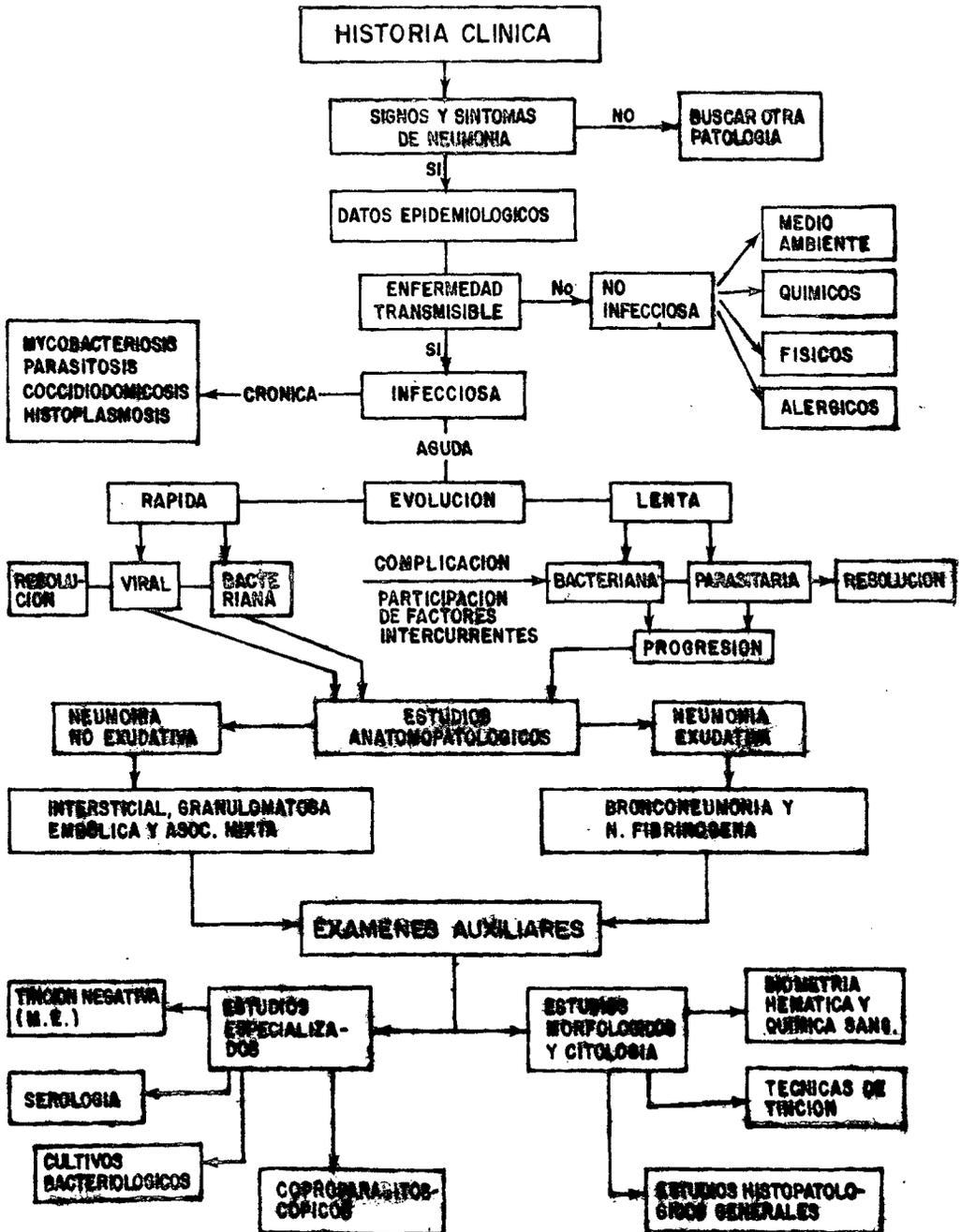
|                  |   |
|------------------|---|
| <b>VIRUS</b>     | <ul style="list-style-type: none"><li>• INFLUENZA PORCINA</li><li>• AUJESKY</li><li>• COLERA PORCINO</li></ul>  |
| <b>BACTERIAS</b> | <ul style="list-style-type: none"><li>• MYCOPLASMA hyopneumoniae</li><li>• PASTEURELLA multocida</li><li>• HAEMOPHILUS pleuropneumoniae</li><li>• CORYNEBACTERIUM pyogenes</li><li>• STREPTOCOCCUS zooepidemicus</li><li>• MYCOBACTERIUM avium, bovis</li></ul> |
| <b>HONGOS</b>    | <ul style="list-style-type: none"><li>• HISTOPLASMOSIS</li><li>• COCCIDIODOMICOSIS</li></ul>  |
| <b>PARASITOS</b> | <ul style="list-style-type: none"><li>• METASTRONGYLUS apri, pudendotectus</li><li>• ASCARIS</li><li>• TOXOPLASMA gondii</li></ul>  |

**Cuadro No. 2.- CARACTERISTICAS CLINICAS DE LAS PRINCIPALES PATOLOGIAS INFECCIOSAS PULMONARES DEL CERDO**

| PATOLOGIA                | EPIZOOTIOLOGIA         | CURSO           | FIEBRE | TOS          | TIPO DE RESPIRACION | LOCALIZACION                         |
|--------------------------|------------------------|-----------------|--------|--------------|---------------------|--------------------------------------|
| PLEUROPNEUMONIA          | 30 - 40 Kilos          | Agudo           | +      | Húmeda       | Diafragmát. rápido  | Lóbulo diafragmático                 |
| PASTURELOSIS             | 8a. -10a. semana       | Agudo y crónico | +      | Húmeda       | Difícil             | Anteriores<br>Posteriores            |
| ESTREPTOCOCOSIS          | Jovenes principalmente | Crónico         | +      | al asociarse | —                   | Generalizada                         |
| CORYNEBACTERIUM PYOGENES | Todas                  | Crónico         | +      | Seca y debil | Abdominal           | Generalizada                         |
| SALMONELLA TYPHISUIS     | Todas                  | Aguda           | +      | Húmeda       | —                   | Generalizada                         |
| TUBERCULOSIS             | Jovenes principalmente | Crónica         | +      | Seca húmeda  | —                   | Generalizada                         |
| INFLUENZA                | Jovenes                | Aguda           | +      | Paroxística  | Superficial         | Lóbulos apical y cardíaco            |
| COLERA PORCINO           | Todas                  | Aguda           | +      |              | Disnea              | Generalizada                         |
| AUJESKY                  | Lechones               | Aguda           | +      | Ligera       | —                   | Lóbulos apical y cardíaco            |
| METASTRONGILOSIS         | 2 - 8 semanas          | Crónico         | —      | Seca         | Con estertores      | Borde ventral de lob. diafragmáticos |
| TOXOPLASMOSIS            | Todas                  | Agudo y crónica | +      | Seca         | Disnea              |                                      |
| NEUMONIA ENZOOTICA       | 15-20 días postdestete | Crónico         | +      | Seca         | Difícil             | Lóbulos anteriores (apicales)        |

| PATOLOGIA                | ASOCIACIONES                                      | LESIONES MACROSCOPICAS   | LESIONES MICROSCOPICAS  | OTROS  |
|--------------------------|---|--|---|--|
| PLEUROPNEMONIA           |   | Infarto rojo en lob. diaf. adherencia pleurales, hidrotorax, pericarditis.     | Congestión, edema alveolar<br>infiltración peribronquial<br>perivascular                  | Epistaxis posición de "perro sentado"            |
| PASTEURELOSIS            | Virosis<br>M. Hypopneumoniae<br>B. Bronchiseptica | Consolidación rojo-grisácea, adherencias serofibrinosas, exudado mucopurulento | Bronconeumonía exudativa lobular, atelectasia, infiltración PB, infiltración perivascular | Aborto y signos nerviosos en ocasiones.          |
| ESTREPTOCOCCOSIS         | P. multocida<br>C. pyogenes<br>s. aureus          | Abscesos   | Pleuroneumonía supurativa   | Hematoma subcutáneo en región del codo           |
| CORYNEBACTERIUM PYOGENES | Corynebacterium<br>Estafilococos                  | Abscesos de color gris amarillento   | Pleuroneumonía purulenta fibrinosa  | Artritis, peritonitis                            |
| SALMONELLA TYPHISCIS     | E. coli   | Consolidación rojo intenso en parches  | Neumonía intersticial   | Enteritis catarral, Petequias en riñón           |
| TUBERCULOSIS             |   | Tubérculos pulmonares<br>Ganglios aumentados                                   | Proliferación periférica de fibroblastos caseosis   | Aborto, signos digestivos, signos nerviosos.     |
| INFLUENZA                | Metastrongilosis                                  | Enfisemas, zonas rojas y moco en bronquios y bronquiolos                       | Neumonía exudativa con abundantes PMN, infiltración peribronquial                         | Mortalidad debida a complicaciones               |
| COLERA PORCINO           | Metastrongilosis                                  | Congestión, infarto, petequias en pulmón                                       | Bronconeumonía, atelectasia   | Petequias en glotis, riñón, bazo, conjuntivitis. |
| AUJESKY                  | P. multocida<br>Bacterias pyogenas                | Consolidación roja y bronquitis  | Edema en espacios interlobulares y cuerpos de inclusión intranucleares                    | Signos nerviosos                                 |
| METASTRONGILOSIS         | P. multocida<br>Influenza, Haemophilus pleuropn.  | Enfisema vesicular superficial, nódulos pseudotuberculosos con eosinófilos.    | Reacción proliferativa y peribronquial  | Eosinofilia                                      |
| TOXOPLASMOSIS            |   | Necrosis focal   | Neumonía fibrinosa<br>Infiltración granulomatosa y fibrosis                               | Necrosis en hígado.<br>Linfadenitis, enteritis   |
| NEUMONIA ENZOOTICA       | P. multocida<br>Virosis                           | Consolidación rojo-grisácea, pleuritis, pericarditis                           | Neumonía catarral supurativo, cuerpos de inclusión<br>Infiltración peribronquial          | erupciones cutáneas (tizne, sarna pecaña)        |

**Cuadro No. 3 - Diagrama de flujo para el establecimiento del diagnóstico. Procedimiento iterativo.**



## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que las técnicas de diagnóstico que habitualmente se emplean para el estudio de patologías pulmonares plantean distintas limitaciones en cuanto a equipo, disponibilidad de reactivos, así como del tiempo que requieren para obtener resultados, y puesto que en los cerdos los trastornos respiratorios son altamente frecuentes e importantes para la salud del animal, es necesario valorar la efectividad del uso de técnicas de coloración de material exudativo en extensión, como un recurso auxiliar para el diagnóstico de estos problemas.

## H I P O T E S I S

Es posible utilizar las técnicas de tinción en frotis como un recurso diagnóstico para patologías pulmonares, al correlacionar el grupo de microorganismos presentes con la respuesta tisular observada.

## O B J E T I V O S

## Objetivo General:

Valorar la eficacia de diferentes técnicas de tinción para el estudio en frotis de material exudativo como un recurso auxiliar para el diagnóstico de patologías pulmonares.

## Objetivos Particulares:

1. Reconocer las diferentes estirpes celulares que se presentan en frotis impronta del material exudativo proveniente de pulmones normales, con bronconeumonía y neumonía fibrinógena.
2. Definir la afinidad tintorial de cada una de las estirpes celulares mediante 6 diferentes procedimientos de tinción.
3. Establecer las variaciones en el número y el tipo de células presentes en el material exudativo al comparar los tres grupos estudiados: normales, con bronconeumonía y neumonía fibrinógena.
4. Determinar la presencia de microorganismos en el material exudativo pulmonar para establecer una relación entre éstos y la variación observada en el número de las estirpes celulares.

## M A T E R I A L   Y   M E T O D O S

Se utilizaron 120 pulmones de cerdos para abasto, sacrificados en el rastro de Zapopan, Jalisco, con edad promedio de 6 meses. Veinte de estos pulmones no mostraron alteraciones, por lo que de éstos se obtuvieron muestras que se utilizaron como control, del resto de animales solamente se seleccionaron pulmones que mostraban signos de neumonía exudativa manifiesta por zonas de consolidación del parénquima pulmonar, engrosamiento de la pleura visceral y fragilidad tisular, entre los cambios más importantes (13) .

Inmediatamente después de la muerte del animal se disecó el colgajo visceral torácico, después de lavarlo se inspeccionó para seleccionar el área afectada, en la que se realizaron cortes profundos de los cuales se obtuvieron 8 extensiones del material exudativo por compresión del tejido, la gota producida se extendió en portaobjetos previamente desinfectados. Todo el procedimiento descrito se desarrolló rápidamente (5 minutos) para evitar contaminaciones secundarias.

Cada frotis se fijó en Alcohol Etilíco Absoluto durante 3 minutos, posteriormente se dejó secar antes de proceder a la tinción diferencial de las laminillas con los siguientes métodos:

1. Gram (4,8).
2. Giemsa (30).
3. Acido Peryódico de Schiff (5).
4. Wright (30).
5. Ziehl Neelsen (4).
6. Gridley (5).

Las técnicas descritas permiten identificar los diferentes tipos de microorganismos presentes, tanto en procesos patológicos tisulares, como tejidos normales (consultar

cuadro Nº 4) y fueron seleccionadas con base a sus indicaciones particulares.

Para examinar el material teñido se seleccionaron al azar diferentes campos en cada una de las laminillas (8 en promedio) las cuales se revisaron completamente a diferentes ampliaciones, con el objetivo de inmersión se hizo la identificación de los elementos presentes, que en su mayoría fueron células pulmonares, sanguíneas y bacterias.

Los valores obtenidos tanto individuales como en grupo fueron sometidos a tratamiento estadístico con la Prueba de Variancia, "T de Student" (33) y el Método de Fisher(7).

Se realizó un estudio fotométrico microscópico a fin de establecer el diámetro promedio y la morfología típica - de de cada una de las estirpes celulares para lo cual se obtuvieron fotomicrografías (Fotomicroscopio Zeiss Fomi 3) sobre las cuales se hicieron las mediciones, estos resultados están representados a escala de  $1 \mu\text{m} - 1 \text{mm}$  en la figura Nº 1 .

Cuadro No. 4.- Principales características de las Técnicas de Tinción

| TECNICA              | REACTIVOS   | INDICACIONES   | DESCRIPCION DE LAS CARACTERISTICAS DE AFINIDAD TINTORIAL   |
|----------------------|---|--|--|
| <b>GRAM</b>          | Cristal violeta<br>Safranina  | Bacterias  | Las bacterias Gram positivas forman un complejo con el cristal violeta y el lugol, el cual no es degradado por el alcohol-acetona; las bacterias Gram negativas no retienen el colorante por efecto de la disolución de lípidos. |
| <b>GIEMSA</b>        | Eosina - azul II  | Micoplasmas<br>Rickettsias<br>Cuerpos de inclusion y<br>Protozoarios | Los azules (colorantes básicos) reaccionan con la acidez nuclear, y la Eosina (colorante ácido) reaccionan con el citoplasma alcalino  |
| <b>WRIGHT</b>        | Metanol de eosina<br>Tiacinas con azul de metileno 50-80 %<br>azul 10-25% y otros | Células sanguíneas   | <i>similar al anterior</i>   |
| <b>ZIEHL-NEELSEN</b> | Leucofucsina<br>Azul de metileno  | Bacterias<br>Alcohol ácido-resistente                                | Las bacterias Alcohol ácido-resistentes presentan una pared celular formada por ceras y glucolípidos (micósidos), que tienen la capacidad de formar complejos estables en presencia de ácidos.                                   |
| <b>P. A. S</b>       | Reactivo de Schiff<br>Hemateína de Mayer<br>Naranja 6                             | Esporas e hifas de hongos  | El ácido peryódico al oxidar los carbonos 2 y 3 de la glucosa, la transforma en un sustrato óptimo para la reacción con leucofucsina produciendo un complejo colorido.   |
| <b>GRIDLEY'S</b>     | Reactivo de Schiff<br>Aldelido-fucsina<br>Amarillo de metanol                     | Esporas e hifas de hongos  | <i>similar al anterior</i>   |

## R E S U L T A D O S

La distribución de patologías pulmonares de un total de 100 muestras analizadas fué: 88 % de bronconeumonías y - 12 % de neumonías fibrinógenas.

Las estirpes celulares observadas en cada una de las técnicas de tinción utilizadas y para cada uno de los grupos estudiados fueron las mismas: neumocitos, linfocitos, - polimorfonucleares neutrófilos, macrófagos y granulocitos - (figura Nº 1) .

De las 6 técnicas estudiadas una de ellas, específica para hongos (Tinción de Gridley) no proporcionó información positiva en el estudio por lo que permite suponer la - ausencia de hongos.

Como se observa en el cuadro Nº 5 para el grupo control, la aplicación de las 5 técnicas de tinción mostró diferencias en cuanto al número de neumocitos y macrófagos observados. La técnica de Ziehl Neelsen reveló valores muy altos de neumocitos y muy bajos de macrófagos (\*) mediante la prueba estadística de Fisher y "T de Student" (7,33), debido posiblemente a que altera la integridad celular por el - tratamiento drástico al que se ven sometidas las células, - lo que impide la distinción entre las estirpes presentes. El resto de las técnicas reveló valores comparables no significativamente diferentes a P 0.05 .

En el grupo con bronconeumonía (cuadro Nº 6) se observaron también valores no significativamente diferentes a P 0.05 entre las 5 técnicas y la totalidad de las estirpes probablemente debido a una mayor afinidad tintorial en todas las células presentes en exudados de animales enfermos, de la misma manera que ocurrió con el grupo de neumonía fibrinógena (cuadro Nº 7) .

Las técnicas de Giemsa y Wright demostraron ser las más adecuadas para la diferenciación de estirpes celulares' aunque solamente la técnica de Wright permite diferenciar en

entre eosinófilos y basófilos, lo cual es importante cuando se trata de definir el grado de evolución de una patología.

En el cuadro Nº 8 se observan los valores que fueron obtenidos de las técnicas que no revelaron variaciones tincionales. Se excluyó para la cuantificación la tinción de Ziehl Neelsen para neumocitos y macrófagos en el grupo control. En el cuadro Nº 9 que resume todos los datos anteriores es posible apreciar un número menor de neumocitos en el grupo control mientras que en los grupos experimentales solo hay una escasa diferencia posiblemente debido a la falta de integridad del parénquima pulmonar en los grupos patológicos ya que en éstos se observó lisis celular en un gran número de campos (gráfica Nº 1) .

El total de polimorfonucleares neutrófilos fué mayor en el grupo con bronconeumonía y ligeramente menor en el grupo con neumonía fibrinógena (gráfica Nº 2) .

En cuanto al número de linfocitos, los valores obtenidos en los grupos experimentales mostraron cierta semejanza y fueron mayores que en el grupo control (gráfica Nº 3). La cantidad de macrófagos y granulocitos fué mayor en el grupo con bronconeumonía, mientras que el grupo con neumonía fibrinógena reveló valores ligeramente mayores que en control (gráficas Nº 4 y 5) .

En general, el grupo con bronconeumonías siempre mostró los valores máximos, contrariamente al grupo control -- que reveló los valores mínimos; ambos mantuvieron esta relación a través del estudio.

Los datos anteriormente descritos sugieren que el aumento de células observado en bronconeumonía es debido a un estado activo de enfermedad, mientras que en la neumonía fibrinógena se encontró menor cantidad probablemente debido a la naturaleza crónica del proceso que manifiesta una estabilización de la patología o involución de la misma.

Para mantener una idea más firme sobre la confiabilidad de los procedimientos tintoriales en frotis impronta, se determinó el coeficiente de variación (cuadro Nº 10) con lo cual podemos sugerir que los polimorfonucleares neutrófilos y linfocitos en la bronconeumonía tiene un bajo grado de variación entre las técnicas, ya que el valor numérico encontrado es muy bajo, mientras que los granulocitos presentan un elevado coeficiente de variación, mismo que se interpreta como poco confiable.

El hallazgo de microorganismos fué diferente en los tres grupos estudiados ya que en el grupo control no se encontraron en ninguna tinción, mientras que en los grupos patológicos el número fué distinto en relación con las técnicas de estudio utilizadas debido a que existe una alta especificidad tintorial para cada una de ellas. La observación en el microscópio nos reveló presencia de bacterias y ausencia de hongos, parásitos y cuerpos de inclusión de origen viral.

El recuento diferencial de bacterias se hizo solo en los frotis teñidos con la tinción de Gram. Al comparar los valores porcentuales de bacterias entre ambos grupos experimentales se encontró un 48.9 % de muestras con bacterias para el grupo de Bronconeumonía, con predominio de bacilos -- gram negativos y en ocasiones esporádicas cocos gram positivos. En el grupo con neumonía fibrinógena se encontró un 41.7 % de muestras con bacterias, las más abundantes fueron cocobacilos gram negativos. Los cocos gram positivos aparecieron en un número mayor de muestras pero en menor proporción que los cocobacilos. En ambos grupos se encontró la misma relación de muestras con bacilos gram positivos con un valor de la media muy bajo (0.6) .

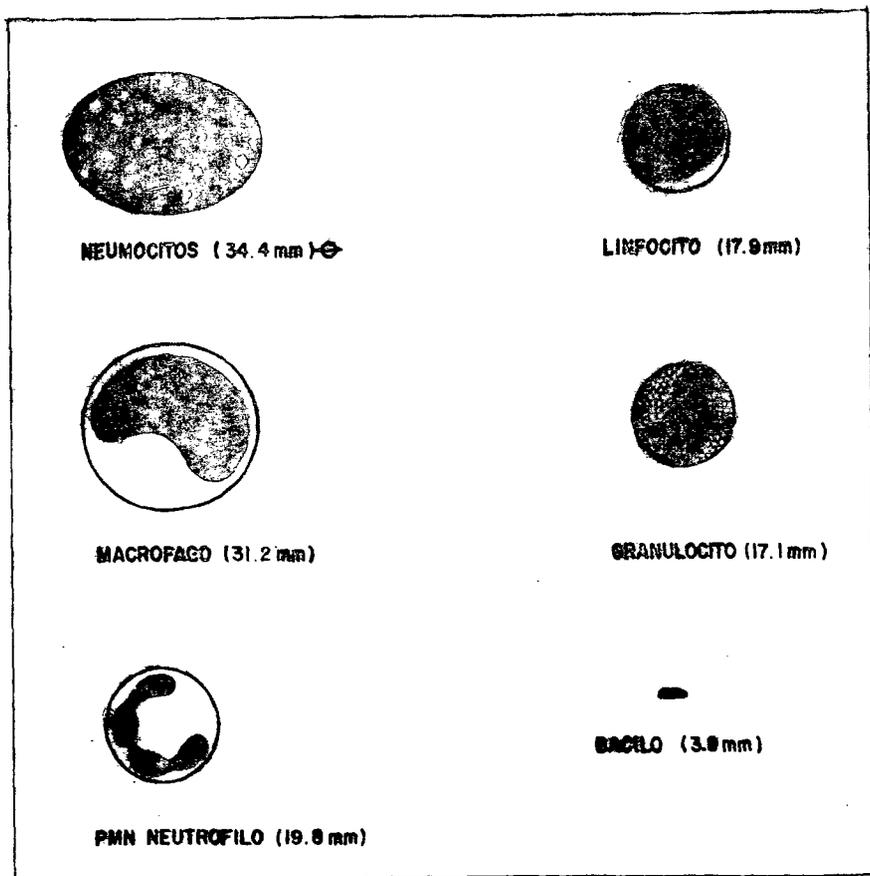
Por último el número de bacterias totales fué mayor en el grupo con bronconeumonía que en el grupo con neumonía fibrinógena (cuadro Nº 11) .

La presencia de bacilos alcohol ácido resistentes -- (B.A.A.R.) fué detectada en 5 casos con bronconeumonía y --

ninguno con neumonía fibrinógena o en el grupo control (cuadro Nº 12) .

La proporción varió de 4 B.A.A.R. en 5 campos hasta 1 bacilo cada 10 campos en las diferentes muestras. En todas ellas se encontraron asociaciones bacterianas escasas y las células presentes fueron principalmente neumocitos y linfocitos.

**Figura 1: Estampas celulares obtenidas con 5 técnicas tintoriales diferentes, mediante el estudio de impresos obtenidos de pulmones sanos y enfermos.**



⊕ DIMENSIONES PROMEDIO DEL DIAMETRO MAXIMO  
 1 μm = 1mm PARA ESTABLECER LA ESCALA DE TAMAÑO CELULAR

**Grafica No. 1:** Valores de las medias obtenidas de los neumocitos por campo bajo las diferentes técnicas tintoriales.  
 Las muestras control al igual que las experimentales muestran valores semejantes. ( $P < 0.05$ )

### NEUMOCITOS

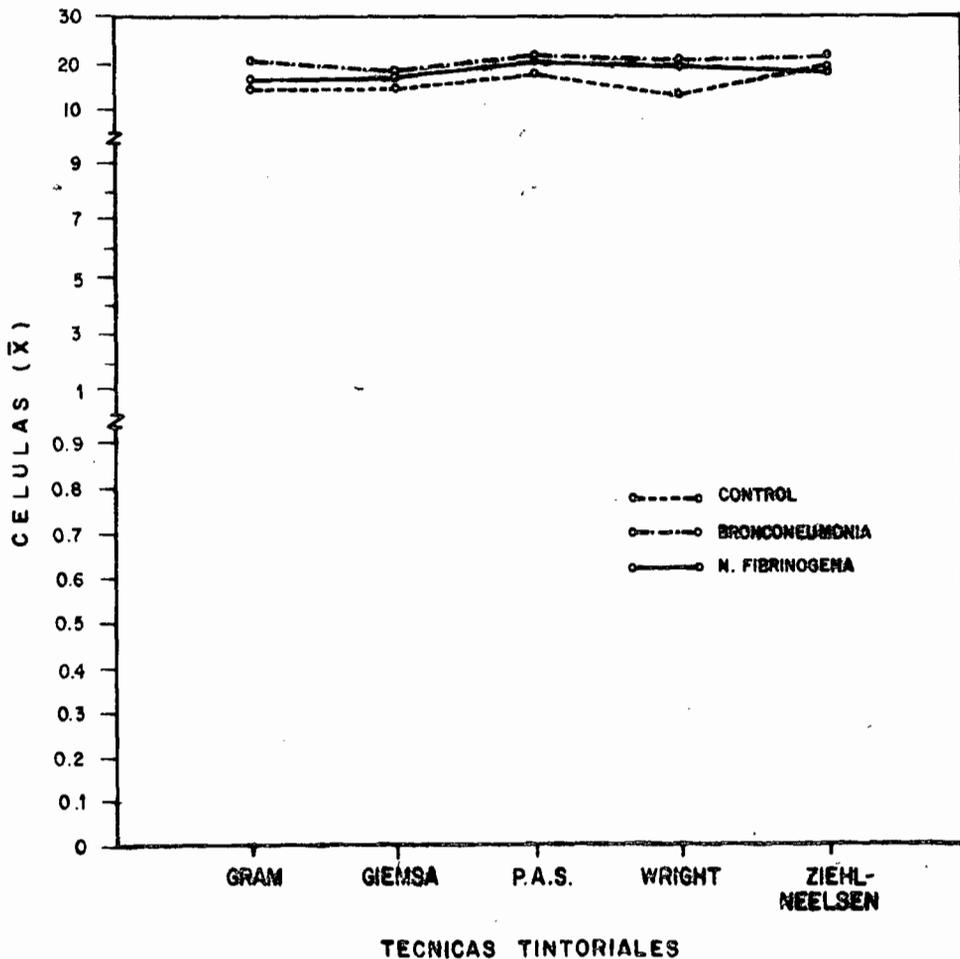
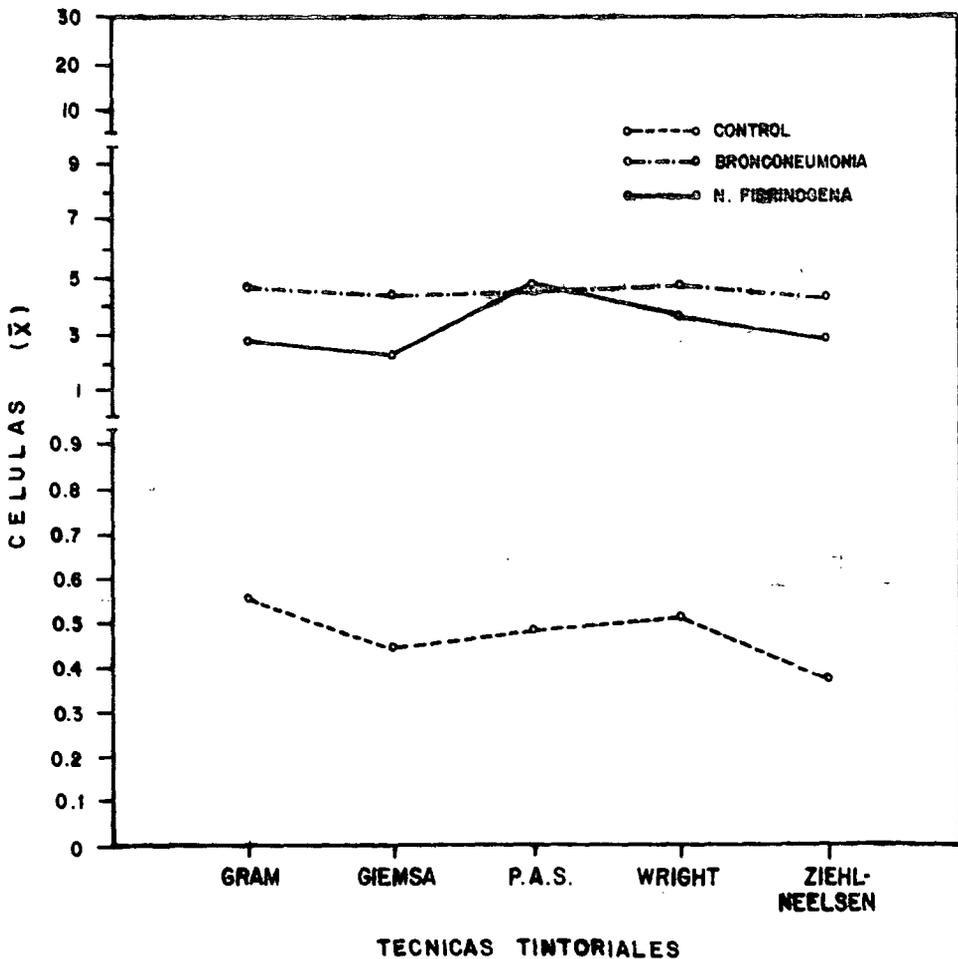


Gráfico No. 2.- Valores de las medias obtenidas de los neutrófilos por campo del total de Técnicas de Tinción.

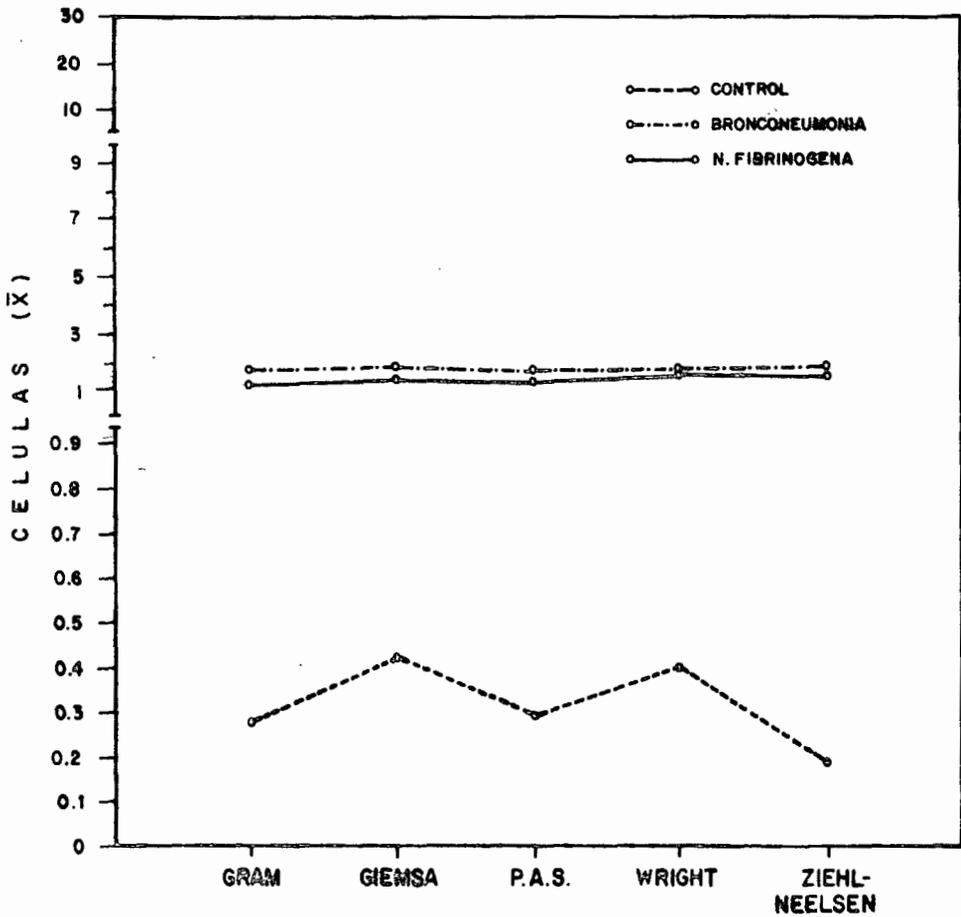
Los valores de los grupos experimentales muestran un número mayor de células con respecto al grupo control, es ligeramente mayor el valor del grupo con bronconeumonía. ( $P < 0.05$ )

## NEUTROFILOS



Gráfica No. 3 - Resultados de los valores promedio para linfocitos por campo. Los grupos experimentales muestran claramente una tendencia a un número mayor de células por campo con respecto al grupo control. ( $P < 0.05$ )

## LINFOCITOS



Gráfica No. 4.- Valores que expresan las medias obtenidas del total de macrófagos por campo. El grupo de bronconeumonía muestra un número mayor de células por campo, mientras que las extensiones de neumonía fibrinógena un número de células ligeramente mayor que el grupo control. ( $P < 0.05$ )

### MACROFAGOS

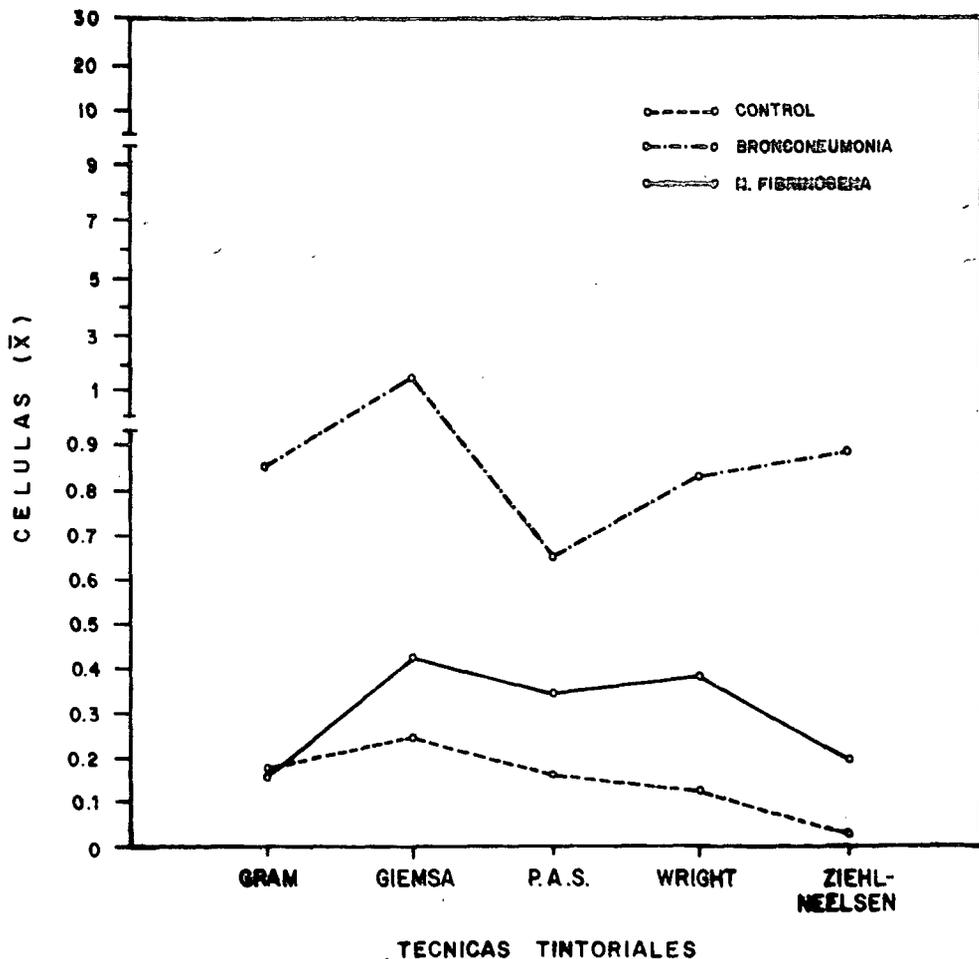
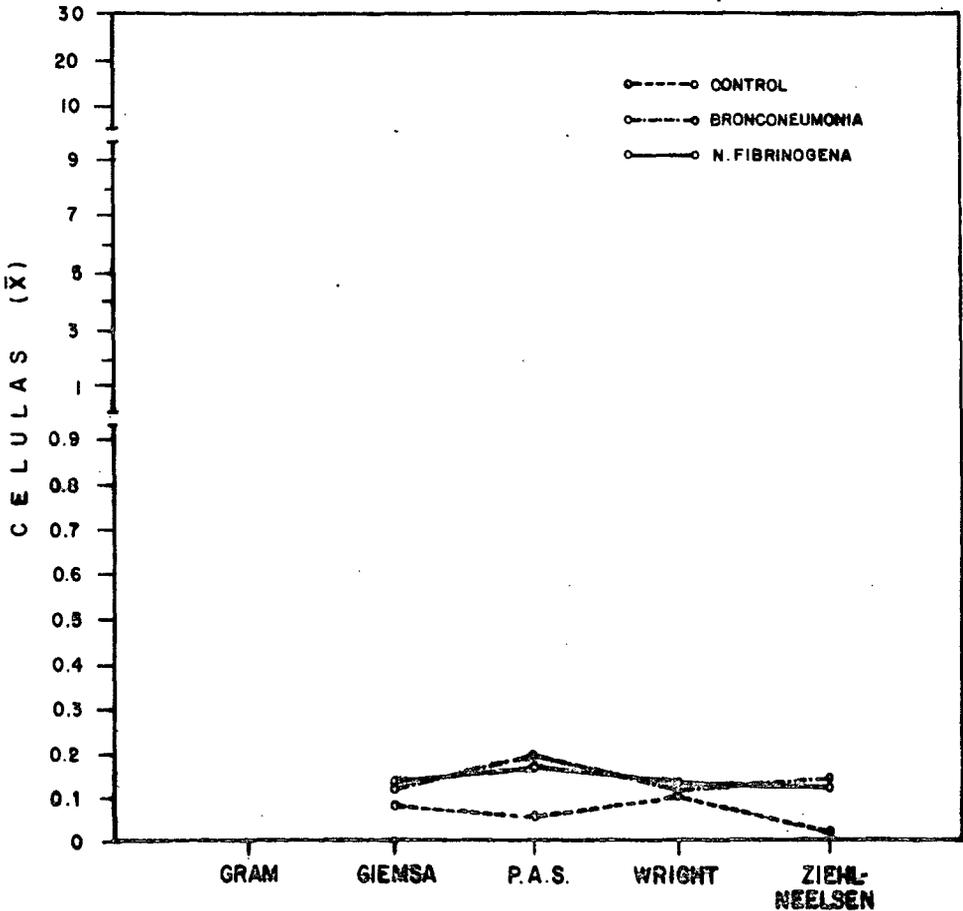


Gráfico No. 5.- Resultados obtenidos de los granulocitos por campo con las diferentes técnicas tintoriales.

Los valores experimentales muestran datos semejantes que son ligeramente mayores que los valores del grupo control. ( $P < 0.05$ )

### GRANULOCITOS (EOSINOFILOS Y BASOFILOS)



Cuadro No. 5- Resultados obtenidos del grupo control para la identificación de la población celular presente mediante la aplicación de 5 técnicas tintoriales.

RESULTADOS  
GRUPO CONTROL

n = 20

|                                      |   | TINCIONES |       |       |       |       |        |                 |        |
|--------------------------------------|---|-----------|-------|-------|-------|-------|--------|-----------------|--------|
|                                      |   | 1         | 2     | 3     | 4     | 5     | TOTAL  |                 |        |
| E<br>S<br>T<br>I<br>R<br>P<br>E<br>S | A | $\Sigma$  | 285.6 | 291.  | 300.2 | 243.3 | 388. * | $\bar{X}\Sigma$ | 282.02 |
|                                      |   | $\bar{X}$ | 14.28 | 14.55 | 15.41 | 12.16 | 19.4   | $\bar{X}t$      | 14.1   |
|                                      |   | S         | 4.322 | 6.083 | 5.60  | 4.454 | 4.41   | St              | 1.377  |
|                                      | B | $\Sigma$  | 11    | 9.1   | 9.5   | 10.2  | 7.5    | $\bar{X}\Sigma$ | 9.46   |
|                                      |   | $\bar{X}$ | 0.55  | 0.455 | 0.475 | 0.51  | 0.375  | $\bar{X}t$      | 0.473  |
|                                      |   | S         | 0.266 | 0.228 | 0.332 | 0.497 | 0.271  | St              | 0.065  |
|                                      | C | $\Sigma$  | 5.6   | 8.4   | 5.9   | 8.0   | 3.9    | $\bar{X}\Sigma$ | 6.36   |
|                                      |   | $\bar{X}$ | 0.28  | 0.42  | 0.295 | 0.40  | 0.195  | $\bar{X}t$      | 0.318  |
|                                      |   | S         | 0.254 | 0.246 | 0.252 | 0.419 | 0.237  | St              | 0.09   |
|                                      | D | $\Sigma$  | 3.7   | 4.8   | 3.3   | 2.3   | 0.6    | $\bar{X}\Sigma$ | 3.52   |
|                                      |   | $\bar{X}$ | 0.185 | 0.24  | 0.165 | 0.115 | 0.03 * | $\bar{X}t$      | 0.176  |
|                                      |   | S         | 0.155 | 0.278 | 0.172 | 0.095 | 0.065  | St              | 0.051  |
|                                      | E | $\Sigma$  | 0.00  | 1.6   | 1.0   | 4.4   | 0.2    | $\bar{X}\Sigma$ | 1.8    |
|                                      |   | $\bar{X}$ | 0.00  | 0.08  | 0.05  | 0.11  | 0.01   | $\bar{X}t$      | 0.062  |
|                                      |   | S         | 0.00  | 0.105 | 0.114 | 0.091 | 0.044  | St              | 0.042  |

- 1 GRAM
- 2 GIEMSA
- 3 P. A. S.
- 4 WRIGHT
- 5 ZIEHL-NEELSEN

- A NEUMOCITOS
- B NEUTROFILOS
- C LINFOCITOS
- D MACROFAGOS
- E GRANULOCITOS

- $\Sigma$  Sumatoria
- $\bar{x}$  Medio
- S Desviación estandar
- $\bar{X}\Sigma$  Medio de la sumatoria
- $\bar{X}t$  Medio total promedio
- St Desviación total promedio

Cuadro No 6.- Se utilizaron las abreviaturas indicadas en el cuadro No. 5.

**RESULTADOS**  
**GRUPO BRONCONEUMONIA**

n=88

|                                      |   | TINCIONES |        |        |        |        |        |                         |
|--------------------------------------|---|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|-------------------------|
|                                      |   | 1         | 2      | 3      | 4      | 5      | TOTAL  |                         |
| E<br>S<br>T<br>I<br>R<br>P<br>E<br>S | A | Σ         | 1786.7 | 1650.0 | 1923.5 | 1826.7 | 1979.1 | $\bar{X} \Sigma$ 1833.2 |
|                                      |   | $\bar{X}$ | 20.303 | 18.818 | 21.858 | 20.757 | 22.489 | $\bar{X}_t$ 20.84       |
|                                      |   | S         | 8.809  | 9.109  | 10.037 | 10.367 | 10.703 | St 1.42                 |
|                                      | B | Σ         | 413.2  | 387.0  | 409.5  | 419.8  | 389.1  | $\bar{X} \Sigma$ 403.52 |
|                                      |   | $\bar{X}$ | 4.695  | 4.397  | 4.653  | 4.77   | 4.41   | $\bar{X}_t$ 4.585       |
|                                      |   | S         | 5.713  | 5.526  | 5.284  | 5.567  | 5.228  | St 0.17                 |
|                                      | C | Σ         | 154.6  | 158.9  | 154.0  | 154.3  | 159.8  | $\bar{X} \Sigma$ 156.32 |
|                                      |   | $\bar{X}$ | 1.756  | 1.805  | 1.75   | 1.753  | 1.815  | $\bar{X}_t$ 1.778       |
|                                      |   | S         | 2.031  | 1.986  | 2.565  | 1.902  | 2.338  | St 0.031                |
|                                      | D | Σ         | 75.0   | 92.8   | 57.2   | 73.1   | 78.3   | $\bar{X} \Sigma$ 75.28  |
|                                      |   | $\bar{X}$ | 0.852  | 1.054  | 0.65   | 0.83   | 0.889  | $\bar{X}_t$ 0.855       |
|                                      |   | S         | 1.349  | 1.404  | 1.145  | 1.165  | 1.395  | St 0.144                |
|                                      | E | Σ         | 0.00   | 10.09  | 17.5   | 20.6   | 12.0   | $\bar{X} \Sigma$ 15.25  |
|                                      |   | $\bar{X}$ | 0.00   | 0.123  | 0.198  | 0.117  | 0.136  | $\bar{X}_t$ 0.143       |
|                                      |   | S         | 0.00   | 0.34   | 0.378  | 0.122  | 0.266  | St 0.037                |

Cuadro No.7 - Se utilizaron las abreviaturas indicadas en el cuadro No 5

## RESULTADOS GRUPO N. FIBRINOGENA

|                                      |   | TINCIONES |        |        |        |        |        |                 |        |
|--------------------------------------|---|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|-----------------|--------|
|                                      |   | 1         | 2      | 3      | 4      | 5      | TOTAL  |                 |        |
| E<br>S<br>T<br>I<br>R<br>P<br>E<br>S | A | Σ         | 197.9  | 208.5  | 240.5  | 237.3  | 225.1  | $\bar{X}\Sigma$ | 221.86 |
|                                      |   | $\bar{X}$ | 16.491 | 17.375 | 20.041 | 19.775 | 18.758 | $\bar{X}t$      | 18.48  |
|                                      |   | S         | 4.92   | 7.704  | 6.985  | 7.197  | 6.608  | St              | 1.53   |
|                                      | B | Σ         | 35.0   | 30.9   | 58.4   | 43.4   | 35.6   | $\bar{X}\Sigma$ | 40.66  |
|                                      |   | $\bar{X}$ | 2.918  | 2.575  | 4.866  | 3.618  | 2.966  | $\bar{X}t$      | 3.388  |
|                                      |   | S         | 4.385  | 2.906  | 6.147  | 4.495  | 3.881  | St              | 0.903  |
|                                      | C | Σ         | 15.3   | 16.7   | 15.5   | 19.4   | 18.7   | $\bar{X}\Sigma$ | 17.12  |
|                                      |   | $\bar{X}$ | 1.275  | 1.391  | 1.291  | 1.618  | 1.558  | $\bar{X}t$      | 1.426  |
|                                      |   | S         | 1.138  | 1.225  | 1.695  | 1.269  | 1.832  | St              | 0.154  |
|                                      | D | Σ         | 2.1    | 5.1    | 4.1    | 4.5    | 2.4    | $\bar{X}\Sigma$ | 3.64   |
|                                      |   | $\bar{X}$ | 0.175  | 0.425  | 0.341  | 0.375  | 0.2    | $\bar{X}t$      | 0.303  |
|                                      |   | S         | 0.351  | 0.525  | 0.638  | 0.497  | 0.343  | St              | 0.11   |
|                                      | E | Σ         | 0.00   | 1.6    | 2.1    | 3.2    | 1.4    | $\bar{X}\Sigma$ | 2.07   |
|                                      |   | $\bar{X}$ | 0.00   | 0.133  | 0.175  | 0.133  | 0.116  | $\bar{X}t$      | 0.139  |
|                                      |   | S         | 0.00   | 0.222  | 0.23   | 0.153  | 0.119  | St              | 0.024  |

Cuadro No. 8.- Resumen del número total de las diferentes estirpes celulares observadas por campo microscópico con cinco diferentes técnicas de tinción para cada uno de los grupos estudiados.

| ESTIRPE      |             | CONTROL | BRONCONEUMONIA | N. FIBRINOGENA |
|--------------|-------------|---------|----------------|----------------|
| NEUMOCITOS   | $\Sigma$    | 282.02  | 1,833.2        | 221.86         |
|              | $\bar{X}$   | 14.1    | 20.84          | 18.48          |
|              | S           | 1.377   | 1.42           | 1.53           |
|              | S $\bar{x}$ | .688    | .639           | .686           |
| NEUTROFILOS  | $\Sigma$    | 9.46    | 403.52         | 40.66          |
|              | $\bar{X}$   | .473    | 4.585          | 3.388          |
|              | S           | .065    | .17            | .908           |
|              | S $\bar{x}$ | .029    | .076           | .407           |
| LINFOCITOS   | $\Sigma$    | 6.36    | 156.32         | 17.12          |
|              | $\bar{X}$   | .318    | 1.776          | 1.426          |
|              | S           | .092    | .031           | .154           |
|              | S $\bar{x}$ | .04     | .014           | .069           |
| MACROFAGOS   | $\Sigma$    | 3.52    | 75.28          | 3.64           |
|              | $\bar{X}$   | .176    | .855           | .303           |
|              | S           | .051    | .144           | .11            |
|              | S $\bar{x}$ | .025    | .064           | .049           |
| GRANULOCITOS | $\Sigma$    | 1.8     | 15.25          | 2.07           |
|              | $\bar{X}$   | .062    | .143           | .139           |
|              | S           | .042    | .037           | .024           |
|              | S $\bar{x}$ | .021    | .018           | .012           |

Todos estos valores son estadísticamente significativos a  $P < 0.05$

Cuadro No. 9 - Relación de la proporción numérica celular observada en cada uno de los grupos estudiados.

(valores promedios de la sumatoria de medidas del total de técnicas)

| GRUPOS DE ESTUDIO             |           |         |                |        |                |        |
|-------------------------------|-----------|---------|----------------|--------|----------------|--------|
| ESTIRPE CELULAR               | CONTROL   |         | BRONCONEUMONIA |        | N. FIBRINOGENA |        |
|                               | $\bar{x}$ | S       | $\bar{x}$      | S      | $\bar{x}$      | S      |
| NEUMOCITOS                    | 14.1      | ± 1.377 | 20.84          | ± 1.42 | 18.48          | ± 1.54 |
| (Polimorfonucleares)<br>P M N | .473      | ± .063  | 4.585          | ± .17  | 3.368          | ± .908 |
| LINFOCITOS                    | .318      | ± .092  | 1.776          | ± .031 | 1.426          | ± .154 |
| MACROFAGOS                    | .176      | ± .051  | .855           | ± .144 | .303           | ± .11  |
| GRANULOCITOS                  | .062      | ± .042  | .143           | ± .037 | .139           | ± .024 |

Cuadro No. 10.- Valores indicativos de confiabilidad metodológica tintorial mediante las 5 Técnicas de coloración en tres estados fisiológicos diferentes de los pulmones analizados.

**COEFICIENTE DE VARIACION**  
(EXPRESION PORCENTUAL)

$$CV = \frac{S}{\bar{X}}$$

| ESTIRPE            | CONTROL | BRONCONEUMONIA | N. FIBRINOSA |
|--------------------|---------|----------------|--------------|
| NEUMOCITOS         | 9.76 %  | 6.81 %         | 8.27 %       |
| PMN<br>Neutrófilos | 13.74   | 3.7            | 26.8         |
| LINFOCITOS         | 28.93   | 1.74           | 8.09         |
| MACROFAGOS         | 28.97   | 16.83          | 36.3         |
| GRANULOCITOS       | 67.74   | 25.87          | 17.26        |

**Cuadro No. 11.- Análisis numérico de la morfología bacteriana encontrada en los frotis teñidos con Gram de los grupos de bronconeumonía y neumonía fibrinógena.**

| <b>FORMA BACTERIANA</b>           | <b>BRONCONEUMONIA</b>                    | <b>N. FIBRINOGENA</b>                  |
|-----------------------------------|--|--|
| <b>Bacilos Gram positivos</b>     | 5/88 (5.7) $\bar{X}$ = 0.6<br>S = 0.5    | 2/12 (16.7) $\bar{X}$ = 0.6<br>S = 0.6 |
| <b>Bacilos Gram negativos</b>     | 32/88 (36.4) $\bar{X}$ = 2.3<br>S = 11.7 | 1/12 (8.3) $\bar{X}$ = 0.3<br>S = -    |
| <b>Cocobacilos Gram negativos</b> | 4/88 (4.5) $\bar{X}$ = 1.3<br>S = 1.0    | 2/12 (16.7) $\bar{X}$ = 2<br>S = 0.7   |
| <b>Cocos Gram positivos</b>       | 17/88 (19.3) $\bar{X}$ = 0.9<br>S = 1.3  | 3/12 (25) $\bar{X}$ = 0.6<br>S = 0.6   |
| <b>TOTAL</b>                      | 43/88 (48.9) $\bar{X}$ = 2.3<br>S = 4.6  | 5/12 (41.7) $\bar{X}$ = 1.5<br>S = 1.5 |

/ Número de Casos positivos / número total de muestras

( ) Porcentaje

$\bar{X}$  Media del número de bacterias por campo encontradas en los frotis teñidos

**Cuadro No. 12.- Casos de bronconeumonía con B.A.A.R. encontrados en los frotis teñidos con Ziehl Neelsen.**

| No. DE MUESTRA | B. A. A. R. | ASOCIACIONES CON BACTERIAS                   | ASOCIACIONES CON CELULAS ( $\bar{x}$ ) |     |     |     |     |
|----------------|-------------|--|--|-----|-----|-----|-----|
|                |             |  | N                                      | L   | PMN | M   | G   |
| 39             | 1/5 campos  | 7/10 campos<br>B.G. +                        | 16.7                                   | 0   | 0.1 | 0   | 0   |
| 46             | 1/10 campos | 1/10 campos<br>B.G. -                        | 17.5                                   | 0.5 | 0   | 0   | 0   |
| 49             | 3/10 campos | 3/10 campos<br>C.G. +                        | 23.5                                   | 0.3 | 0   | 0.1 | 0   |
| 61             | 4/5 campos  | 4/5 campos<br>C.G. +                         | 11                                     | 0.3 | 0.2 | 0   | 0   |
| 72             | 1/10 campos | 4/5 campos<br>B.G. -<br>1/5 campos +<br>B.G. | 24.7                                   | 4.5 | 0   | 0   | 0.1 |

**Abreviaturas :**

- B. A. A. R. = BACILOS ACIDO ALCOHOL RESISTENTES**
- B. G. + = BACILOS GRAM POSITIVOS**
- B. G. - = BACILOS GRAM NEGATIVOS**
- C. G. + = COCOS GRAM POSITIVOS**
- N = NEUMOCITOS**
- L = LINFOCITOS**
- PMN = POLIMORFONUCLEARES NEUTROFILOS**
- M = MACROFAGOS**
- G = GRANULOCITOS**

## D I S C U S I O N

Con base a los criterios de selección para pulmones enfermos previamente señalados se obtuvieron 100 muestras de material exudativo, de éstas un 88 % correspondió a exudado piógeno y el resto a fibrinoso. El estudio fué al azar durante los meses de Marzo a Mayo de 1985, el mayor porcentaje sugiere un estado inicial del padecimiento bronconeumónico - cuya progresión conduce a una neumonía fibrinógena cuando no se aplica tratamiento; este estudio desconocía la historia clínica de los animales por lo que no es posible afirmar lo anterior ya que también puede ocurrir el fenómeno inverso.

En la mayoría de los pulmones estudiados la extensión de las lesiones fué difusa principalmente en lóbulos anteriores, con menor frecuencia en lóbulos posteriores y de extensión generalizada, esto sugiere diferentes estadios evolutivos de origen bronconeumónico (16) .

En algunos pulmones además de las alteraciones exudativas se encontraron asociadas lesiones como enfisema, edema, atelectasia, hemorragias y adherencias pleurales que no se evaluaron por no ser el objetivo del estudio.

Una vez que se obtuvieron los datos del examen anatomopatológico para cada pulmón, se realizaron extensiones e - improntas según el tipo de exudado, se fijaron inmediatamente y se llevaron al laboratorio en recipientes especiales. Las mejores preparaciones fueron seleccionadas y teñidas con las 6 técnicas previamente estandarizadas mediante estudios preliminares en frotis sanguíneos, improntas de tejidos, cepas microbianas puras y microcultivos de hongos contaminantes a fin de validar la reactividad adecuada de las sustancias tintoriales.

En el estudio microscópico fué posible identificar -- las siguientes estirpes: neumocitos, polimorfonucleares neu-

trófilos, linfocitos, macrófagos y granulocitos, en todos los grupos.

El término estirpe se utilizó para designar los distintos tipos celulares en base a sus características tintoriales.

En el criterio de clasificación para los neumocitos se incluyeron tanto las células de revestimiento como las septales que son conocidas como neumocitos tipo I y de tipo II respectivamente (12) .

Para la cuantificación de macrófagos no fué posible diferenciar si pertenecía al tipo residente o emigrante. El término polimorfonuclear se utilizó como sinónimo de neutrófilo de manera indistinta y para la clasificación de granulocitos se incluyeron eosinófilos y basófilos.

En cuanto al hallazgo de fibroblastos, células plasmáticas y células cebadas no fué posible cuantificarlas debido a la dificultad que presentó su identificación, y pues to que su variación no representa un dato de gran importancia en los casos con neumonía, quedaron excluidas del total de estirpes.

En el grupo control no se observaron microorganismos lo cual permite suponer que no se produjo contaminación debido al manejo postmortem de los tejidos.

Todas las técnicas estudiadas revelaron la presencia de las estirpes descritas excepto la técnica de Gridley, -- que es específica para hongos, por otra parte con la técnica de Gram no fué posible observar granulocitos ya que ésta es selectiva para bacterias.

Los diferentes tipos de células se observan íntegras con todas las técnicas excepto con Ziehl Neelsen y P.A.S., -- lo anterior sugiere que con estos tratamientos se lisaron las células más susceptibles posiblemente por el proceso de enfermedad ya que ésto no se observó en el grupo control. Con las técnicas de Giemsa y Wright se obtuvieron los resultados más homogéneos.

El número de células de los grupos con neumonía con respecto al control fué siempre mayor debido al proceso inflamatorio, los eritrocitos no se reportaron en este estudio debido a que no proporcionan información precisa sobre los eventos que suceden en las patologías pulmonares, excepto en algunos casos en los que se observaron áreas hemorrágicas macroscópicas, y que mostraron un número elevado de glóbulos rojos.

Los neumocitos fueron ligeramente más abundantes en las muestras patológicas por la mayor fragilidad intersticial que produjo esfacelación al momento de tomar la muestra.

Siempre que se observó exudado mucopurulento el número de polimorfonucleares neutrófilos se encontró aumentado lo cual permite establecer una correlación directa entre apariencia macroscópica y la respuesta tisular que sugiere un proceso inflamatorio activo e inespecífico (2) .

Los dos grupos experimentales revelaron un mayor número de linfocitos, lo que nos indica una respuesta específica con la participación del sistema inmunitario, sin poder precisar si ésta es inicial o tardía, ya que no fué posible diferenciar morfológicamente entre linfoblastos y linfocitos.

El incremento de macrófagos en los casos con bronconeumonía es probablemente debido al origen difuso del padecimiento sobre todo a nivel alveolar, y a la capacidad de mayor diseminación de los macrófagos residentes, ya que por la naturaleza mucopurulenta fluída de las secreciones alcanzan una mayor distribución lo cual no sucede en procesos fibrinoides. En este grupo algunos casos particulares mostraron un número notable de granulocitos eosinófilos que pueden representar una infestación parasitaria previa o activa con localización distal respecto al sitio muestreado, o un estado alérgico, este hallazgo no fué generalizado para el grupo de bronconeumonía que en general mostró los valores mayores de células.

Como no fué posible valorar el estadio evolutivo de los dos padecimientos estudiados, los hallazgos de este trabajo no pueden generalizarse a estudios individuales, para conseguir lo anterior sería necesario homogenizar animales enfermos en etapas precisas de los padecimientos para de esta forma conocer la relación entre enfermedad y número celular, sin embargo el estudio retrospectivo a nivel individual permite una interpretación más precisa de la posible patología (consultar cuadro Nº 3) .

La observación de bacterias para cuantificación solo se consideró en las técnicas de Gram y Ziehl Neelsen debido a la variación tan grande que se encontró en las demás técnicas no específicas para bacterias. Es posible suponer la participación bacteriana en un 48.9 % en el caso con bronco neumonía, principalmente de bacilos gram negativos, mientras que en neumonía fibrinógena un 41.7 % de muestras mostraron bacterias con predominio de cocobacilos gram negativos. En el caso de los bacilos gram negativos posiblemente correspondan a enterobacterias, mientras que los cocobacilos gram negativos podrían pertenecer al género Haemophilus o Pasteurellas, como no se precisó su tipificación se sugiere hacer un estudio que correlacione las variaciones celulares observadas con la identificación bacteriana en cultivo.

La presencia de cocos gram positivos en ambos grupos patológicos puede relacionarse con la naturaleza piógena de los exudados, entre los géneros probablemente productores de éste, están estreptococos, estafilococos o corynebacterias.

Los bacilos gram positivos se observaron en un porcentaje menor en estos grupos y con una media muy baja lo cual sugiere contaminación de las muestras.

Mediante la técnica de Ziehl Neelsen se encontraron 5 muestras con B.A.A.R. en el grupo con bronconeumonía sin poder identificar lesiones sugestivas de tuberculosis en es

tos tejidos, lo anterior indica la presencia de un proceso infeccioso con participación de micobacterias en un estado inicial, sin que sea posible definir los agentes probables (M. bovis, M. avium o M. tuberculosis) como una causa primaria, ya que en todos los casos se observaron otras bacterias asociadas y no se encontró una variación notable en el número de células inflamatorias en estos pulmones respecto al resto, solo se encontró aumentado el número de neumocitos con respecto a la media del grupo control.

En ninguna de las muestras se observaron hongos, cuerpos de inclusión virales o protozoarios (Toxoplasma gondii o Neumocistis carini), en el caso de los dos últimos -- probablemente debido a la poca calidad de las preparaciones cuando se observaron en el microscópio. Como resultado de todo lo anteriormente señalado es posible discutir lo siguiente:

El alto porcentaje de pulmones neumónicos a nivel de rastro confirma la importancia de dirigir la atención a la prevención y tratamiento de estos problemas en las explotaciones porcícolas intensivas debido a que producen retardo en el crecimiento, disminución en la conversión alimenticia alta mortalidad en neonatos y predisposición a otras patologías, con significantes pérdidas económicas (22) .

La aplicación de las técnicas de tinción en el material que se obtuvo de pulmones afectados orienta hacia la posible etiología del padecimiento, además de la historia clínica, sin embargo es necesario complementar estos estudios con procedimientos de alta precisión antes de sugerir una aplicación práctica confiable. Con lo anterior es posible el análisis de los procesos neumónicos, para de esta forma definir los cambios morfológicos tanto macro como microscópicos que se producen y así establecer el grado de evolución en una muestra desconocida.

Es importante hacer notar la necesidad de realizar además exámenes bacteriológicos y serológicos específicos para demostrar el agente infeccioso presente en el padeci--

miento, una vez reunidos todos estos elementos es posible diseñar un sistema preventivo en el cual se valoren:

1. Factores ambientales, cuyas fluctuaciones principalmente de estación y clima favorecen a problemas respiratorios, ya que se ha observado que en los meses de invierno se incrementa el porcentaje de neumonías (20) .
2. Instalaciones, estas proporcionan un ambiente que puede ser perjudicial, tanto por la humedad que se produce como -- por la ventilación que depende de la orientación de las casetas, otro factor importante es el hacinamiento, en explotaciones intensivas se observa un mayor número de padecimientos pulmonares (15) .
3. Manejo, puede ser predisponente para el desencadenamiento de las neumonías, frecuentemente se observa que el transporte, la vacunación y castración inducen el inicio de procesos morbosos (23) .
4. Edad, tanto la incidencia como la gravedad de las neumonías es mayor en animales jóvenes, lo que produce alta mortalidad en la etapa de desarrollo-engorda (27) .
5. Periodicidad de los padecimientos infecciosos, esto permite determinar de manera cíclica la frecuencia de las distintas neumonías y de esta manera programar el calendario de vacunación más adecuado.

El poder valorar el grado de participación de todos estos elementos a tiempo, permite llegar a un diagnóstico -- temprano de cuadros neumónicos incipientes, con el conocimiento de que por cada cerdo con signos clínicos severos de neumonía existen 10 que tienen la enfermedad en menor grado' o de manera asintomática, es importante emprender acciones -- correctivas que eviten el retardo en el desarrollo (32) .

Por lo anterior, el disponer de un modelo predictivo' para la fisiopatología de las neumonías permitirá incorporar el uso rutinario de las técnicas de tinción como instrumento

diagnóstico en granjas porcinas, ya que es un recurso práctico, barato y de gran utilidad al Médico Veterinario.

Del análisis de todo lo anterior se puede inferir la trascendencia y nivel de generalización del presente trabajo.

## C O N C L U S I O N E S

1. De las 100 muestras obtenidas de pulmones anormales un 88 % correspondió a bronconeumonía y el 12 % restante a neumonía fibrinógena mediante el criterio de clasificación anatomopatológica.
2. En ninguna de las improntas preparadas en el grupo control se encontraron bacterias.
3. No fué posible observar hongos, parásitos ni cuerpos de inclusión intracitoplásmicos de origen viral a través del estudio.
4. Las técnicas de Giemsa y Wright permitieron identificar la totalidad de las estirpes celulares con la mejor calidad, mediante procedimientos de extensión en portaobjetos del material presente en parénquima pulmonar de animales sanos y enfermos.
5. En los pulmones con bronconeumonía y neumonía fibrinógena las células polimorfonucleares neutrófilos, linfocitos, macrófagos y granulocitos fueron más numerosos que los observados en el grupo control.
6. De los grupos descritos, las extensiones de bronconeumonía revelaron el mayor número de células.
7. El mayor porcentaje de bacterias observadas (48.9 %) correspondió a los casos con bronconeumonía.
8. Los 5 procedimientos de coloración utilizados permitieron definir un estado de anormalidad al determinarse un aumento del número normal de células presentes en el tejido pulmonar enfermo.

## R E S U M E N

Se estudiaron 120 pulmones de cerdos para abasto con edad promedio de 6 meses, sacrificados en los meses de Marzo a Mayo de 1985, 20 organos normales fueron el control y' del resto se identificó un 88 % de bronconeumonía y el 12 % restante con neumonía fibrinógena.

En todas las preparaciones se identificaron 5 estirpes celulares diferentes: neumocitos, polimorfonucleares -- neutrófilos, linfocitos, macrófagos y granulocitos, el grupo de pulmones con bronconeumonía reveló los valores mayo--res para todas las estirpes a través del estudio, el grupo' de neumonía fibrinógena mostró valores medios y ligeramente mayores que el grupo control.

En las muestras normales no se identificaron microorganismos, los exudados bronconeumónicos presentaron un 48.9 % de muestras con bacterias y el último grupo 41.7 %, especialmente bacilos y cocobacilos gram negativos, además de - las bacterias productoras de material piógeno; 5 muestras' obtenidas de pulmones bronconeumónicos permitieron identificar micobacterias.

La combinación de técnicas: Gram, Giemsa, Ziehl Neelsen, P.A.S., Wright y Gridley, es un procedimiento diagnós-tico auxiliar útil para trastornos pulmonares, los mejores' resultados se obtuvieron con las técnicas de Giemsa y ---- Wright.

## B I B L I O G R A F I A

1. ANGUS M.D. 1980 Apéndice I. Técnicas de Laboratorio auxiliares en el diagnóstico. En: Helmintología Veterinaria la. edición. Ed. El Manual Moderno, México. pp 357 - 368
2. BENTINCK J. SMITH. 1973 Hematología. Cap. 10 En Patología Clínica Veterinaria. Medway William. la. edición Ed. UTEHA, México. pp 208 - 251
3. BLOOD O.H. y J.A. RADOSTIS. 1983 Enfermedades del Aparato Respiratorio. Cap. 10 En: Medicina Veterinaria. 5a. - edición. Ed. Interamericana, México. pp 261 - 186
4. COFFIN D.L. 1981 Fórmulas y Técnicas Cap. 17 En: Laboratorio Clínico en Medicina Veterinaria. 3a. edición. Ed. La Prensa Médica Mexicana, S.A. México pp 308 - 319.
5. CONANT N.F.,DT. SMITH y R.D. BAKER 1972 Apéndice. Colorantes especiales para hongos. En: Micología. 3a. edición. Ed. Interamericana, México. pp 558 - 566.
6. DANNENBERG H.D.,W. RICHTER y W.D. WESCHE 1970 Enfermedades Infecciosas Cap. 3 En: Enfermedades del Cerdo. la. - edición. Ed. Acribia pp 171 - 212.
7. DUNNET C.W. 1955 "A multiple comparisons procedure for comparing several Treatments with a control" J. Amer. Statist. Ass. 50 : 1096 - 1121
8. FREEMAN B.A. 1979 The physical and chemical structure - of bacteria. Cap. 2 En: Textbook of Microbiology Burrows 21 Edición. pp 13 - 47 .

9. GALLARDO OPOZCO M.A. 1980 Estudio Bacteriológico, Micológico e Histopatológico en pulmones neumónicos de cerdos del Estado de México. Tesis profesional F.M.V.Z. U.N.A.M.
10. GONZALEZ VILLALBA J.A. 1980 Contribución al estudio de los Metastrongylus en porcinos sacrificados en el rastro municipal de Cd. Victoria Tamaulipas. Tesis profesional F.M.V.Z. U.A.T.
11. GORDON B.L. 1975 Inmunología Clínica e Inmunopatología En: Lo Esencial de la Inmunología. 2a. edición Ed. El Manual Moderno, México D.F. pp 100 .
12. GRAU H. y P. WALTER 1975 El Aparato Respiratorio. Cap. IV En: Histología y Anatomía Microscópica comparada de los Animales Domésticos. 1a. edición Ed. Labor S.A. España. pp 113 - 117 .
13. HERNANDEZ GOBORA J. 1984 Estudio Anatomopatológico de trastornos pulmonares encontrados en cerdos para abasto sacrificados en el resto municipal de Zapopan, Jal. Tesis profesional F.M.V.Z. U.D.G.
14. HOWARD C.H. y KERNKAMP 1970 Pasteurellosis Cap. 25 En: Enfermedades del cerdo. Dunne Howard W. 1a. edición Ed. Hispano-Americana, México. pp 489 - 493 .
15. JERICHO K.W., S.H. DONE y R.W. SAUNDERS 1975 Pneumonia and efficiency of pig production. Can. Vét. J. 16 (2) : 44 - 49 .
16. JUBB K.V.F. y P.C. KENNEDY 1974 Sistema Respiratorio Cap. 3 En: Patología de los Animales Domésticos. Tomo I Ed. Labor pp 179 - 328 .

17. KARLSON A.G. 1970 Tuberculosis Cap. 27 En: Enfermedades del Cerdo. Dunne Howard W. 1a. edición Ed. Hispano-Americana, México, pp 509 - 525 .
18. LEWIS D.J.A. 1981 Enfermedades (en General) Cap. 7 - En: Enfermedades del Cerdo. 12a. impresión Ed. Continental. pp 159 - 231 .
19. LILLIE R.D. y H.M. FULLMER 1976 Smear preparations, bacteria, protozoa and other parasites. Cap. 16 En: Histopathologic Technic and practical Histochemistry. Ma Graw Hill Book Company, Fourth Edition. pp 719-763..
20. LITTLE T.W.A. 1975 Respiratory disease in pigs: Study Vet. Rec. 96 : 540 - 544 .
21. MERCADILLO J. 1979 Neumonía Micoplásmica. Porcira-  
ma VI (6) : 18 - 20 .
22. MEZA GUITRON J.F. 1974 Estudio Histopatológico en --  
pulmones de cerdos recolectados en el rastro de la Ciu-  
dad de Guadalajara. Tesis profesional F.M.V.Z. U.D.G.
23. MUIRHEAD M.R. 1979 Respiratory diseases of pigs. ---  
Brit. Vet. J. 135 (6) : 497 - 509 .
24. NECOECHEA R.R. y C. PIJOAN 1982 Diagnóstico de las -  
Enfermedades del Cerdo. Editores R.R. Necoechea y C. -  
Pijoan 1a. edición, México.
25. NEUNDORF R. 1974 Enfermedades Infecciosas Cap. 12 En:  
Enfermedades del Cerdo. Ed. Acribia. 1a. edición --  
pp 518 - 582 .
26. OCHOA G. y C. PIJOAN 1980 Neumonía causada por Haemo-

- lus. Porcirama Año 7 VII (73) : 13 - 16 .
27. PIJOAN C. 1979 Interacción Etiológica en la Producción de Neumonía. Porcirama Año 6 VI (69) : 18 - 23 .
28. QUIROZ R.H. 1979 Neumonías Parasitarias del Cerdo. -- Porcirama Año 6 (64) : 5 - 9 .
29. RUNNELLS R.A. y M. WILLIAMS 1982 Sistema Respiratorio Cap. 16 En: Principios de Patología Veterinaria 10a. - edición Ed. Continental. México. pp 461 - 512 .
30. SCHALM O.W. 1964 Métodos y Equipo para el Estudio de sangre Cap. 2 En Hematología Veterinaria 1a. edición Ed. UTEHA, México. pp 31 - 38 .
31. SHOPE R. 1970 Influenza del Cerdo Cap. 5 En: Enfermedades del Cerdo. Dunne Howard W. Ed. Hispano-Americana, México. pp 119 - 137 .
32. STRAW B. 1985 El valor de los exámenes al sacrificio. Industria Porcina Mayo/Junio 5 (3) : 8 - 16 .
33. YA-LUN-CHOU 1977 Análisis Estadístico. 2a. edición -- Ed. Interamericana, México.