

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA**

**Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria**



“Efecto sobre los títulos de anticuerpos y la ganancia de peso de dos esquemas de inmunización contra *Mycoplasma hyopneumoniae* en porcinos de crianza intensiva procedentes de madres sin antecedentes de vacunación”

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO  
VETERINARIO**

**ACOSTA CHANAMÉ JUAN FRANCISCO**

**LIMA-PERÚ**

**2005**

# ÍNDICE

I.	Introducción .....	1
II.	Revisión Bibliográfica .....	3
2.1.	Antecedentes .....	3
2.2.	Etiología.....	4
2.3.	Epidemiología .....	5
2.3.1.	Transmisión .....	7
2.3.2.	Influencia en los parámetros productivos.....	8
2.3.3.	Efectos perjudiciales sobre el sistema respiratorio.....	9
2.3.4.	Problemática a nivel de campo.....	10
2.4.	Signos Clínicos y lesiones.....	11
2.5.	Inmunidad .....	13
2.5.1	Inmunidad Humoral .....	14
2.5.2	Inmunidad Celular .....	17
2.6.	Fisiopatología.....	18
2.7.	Diagnóstico .....	23
2.7.1	Detección de Antígeno .....	25
2.7.1.1	Anticuerpos fluorescentes.....	25
2.7.1.2	Inmunohistoquímica.....	25
2.7.2	Detección de Anticuerpos.....	26
2.7.2.1	Inhibición de la Hemaglutinación.....	26
2.7.2.2	Inmunofluorescencia.....	26
2.7.2.3	Inmunoperoxidasa.....	26
2.7.2.4	Fijación de Complemento.....	27
2.7.2.5	ELISA.....	27
2.7.3	Detección de ADN.....	28
2.7.3.1	Hibridación in situ.....	28
2.7.3.2	Reacción en cadena de la polimerasa.....	28
2.8.	Diagnostico Diferencial.....	29
2.9.	Control y Erradicación.....	30
2.9.1.	Control.....	30
2.9.1.1.	Manejo.....	30

	2.9.1.1.1. Sistemas de producción .....	31
	2.9.1.1.2. Control de la temperatura .....	32
	2.9.1.1.3. Ventilación y control de polvo .....	32
	2.9.1.1.4. Densidad y tamaño de la población..	32
	2.9.1.1.5. Transporte de los cerdos a las unidades de finalización.....	33
	2.9.1.2. Medicación.....	33
	2.9.1.3. Vacunación.....	34
	2.9.1.3.1. Vacunación a una dosis.....	36
	2.9.1.3.2. Vacunación a dos dosis.....	37
	2.9.2 Erradicación.....	38
III.	Materiales y Métodos .....	40
	3.1. Lugar de estudio .....	40
	3.2. Manejo de animales de la granja.....	40
	3.3. Animales y tamaño de la muestra.....	40
	3.4. Diseños Experimentales.....	41
	3.5. Materiales usados durante el muestreo.....	41
	3.6. Materiales y equipos usados en el laboratorio.....	42
	3.7. Método de colección de muestra.....	42
	3.8. Recolección de datos.....	43
	3.8.1. Ganancia de peso.....	43
	3.8.2. Método de detección de anticuerpos:	
	3.8.3. Prueba comercial de ELISA (HerdChek*M hyo).....	42
	3.8.3.1. Preparación de las muestras.....	43
	3.8.3.2. Preparación de la solución de lavado.....	43
	3.8.3.3. Procedimiento del análisis.....	43
	3.8.3.4. Lectura e interpretación de los resultados.....	44
	3.8.4. Evaluación del grado de lesión pulmonar.....	45
	3.9. Análisis Estadístico.....	47
IV.	Resultados .....	48
V.	Discusión .....	51
VI.	Conclusiones .....	56
VII.	Bibliografía citada.....	57
VIII.	Anexos .....	70

## **LISTA DE CUADROS, TABLAS Y GRAFICOS**

CUADRO N° 1 Puntuación según la extensión de la lesión de consolidación pulmonar en cada lóbulo.

CUADRO N° 2 Área de consolidación de los lóbulos pulmonares según puntuación dada.

CUADRO N° 3 Categoría según el volumen de consolidación pulmonar

CUADRO N° 4 Interpretación de los resultados obtenidos en el cálculo del Índice de neumonía (IDN)

TABLA N° 1. Ganancia de peso total de destete a venta (Kg.)

TABLA N° 2. Ganancia de peso total de destete a venta (Kg.) por grupo y sexo

TABLA N° 3. Resultados de parámetros productivos obtenidos del estudio

TABLA N° 4. Título de anticuerpos a *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos provenientes de madres no vacunadas.

GRAFICO N° 1. Título de anticuerpos a *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos provenientes de madres no vacunadas.

## RESUMEN

Se muestrearon noventa lechones provenientes de marranas no vacunadas de crianza intensiva de la provincia de Lima de junio a noviembre del 2003 para evaluar dos programas de vacunación contra *Mycoplasma hyopneumoniae* utilizando tres tratamientos experimentales de igual número de animales ( $n = 30$ ); en el tratamiento 1 los cerdos fueron vacunados a los 35 y 56 días de edad, el tratamiento 2 a la edad de 42 y 56 días y el tratamiento 3 era el grupo de control de la misma edad. El efecto fue medido sobre suero sanguíneo para detectar los títulos de anticuerpos usando la prueba de ELISA (HerdChek\*M hyo) a las 3, 6, 10, 12, 16 y 21 semanas de edad. La toma de muestras de sangre a los 21 y 35 días en los tratamientos fue antes de la vacunación, en donde los títulos de anticuerpos para el tratamiento 2 fueron inferiores ( $p < 0.005$ ) a los tratamiento 1 y el control; sin embargo, después de la vacunación los títulos de anticuerpos aumentaron de modo similar durante el día 70 en ambos tratamientos 1 y 2, pero estos dos tratamientos fueron considerablemente diferentes ( $p < 0.001$ ) que el control. Posteriormente, los niveles de títulos permanecieron estables hasta el final del experimento, pero ambos eran todavía considerablemente diferentes ( $p < 0.005$ ) que el control. No hubo ningún efecto de los tratamientos sobre la ganancia de peso durante el experimento. Se concluye que ambos tratamientos tuvieron una mejor respuesta sobre los títulos de anticuerpos después de la vacunación.

**Palabras clave:** vacunación, *Mycoplasma hyopneumoniae*, anticuerpos, peso, ELISA, porcinos.

## SUMMARY

Ninety piglets non-vaccinated sows of intensive breeding at the province of Lima were used from June to November of 2003 to evaluate two programs of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* using three experimental treatments of equal numbers of animals (n = 30); in treatment 1 the pigs were vaccinated when they were 35 at 56 days of age, treatment 2 was at age 42 and 56 days and treatment 3 was the control group of the same age. The effect was measured on blood serum to detect antibody titers using the ELISA test (HerdChek\*M hyo) at 3, 6, 10, 12, 16 and 21 weeks of age. The blood samples taking at 21 and 35 days were before the vaccination treatments, the antibody titers for treatment 2 was lower ( $p < 0.005$ ) than these of treatment 1 and control; however, after vaccination the antibody titers increased similarly on day 70 in both treatments 1 and 2, but these two treatments were significantly ( $p < 0.001$ ) different that the control. Afterwards the titers levels remained steady until the end of the experiment, but both were still significantly ( $p < 0.005$ ) different that the control. There was no effect of treatments on body weight gain during the experiment. It was concluded that these were a better response on the antibody titers after vaccination.

**Key words:** vaccination, *Mycoplasma hyopneumoniae*, antibodies, weight, ELISA, pigs.

## I. INTRODUCCIÓN

La neumonía enzoótica causada por *Mycoplasma hyopneumoniae*, está considerada como una de las enfermedades de mayor prevalencia que actualmente afectan al ganado porcino a nivel mundial y está también implicado en el complejo respiratorio porcino. La neumonía enzoótica es un síndrome con baja mortalidad pero con grave impacto en los parámetros productivos en los cerdos de engorde, disminuyendo la ganancia media diaria y eficiencia de conversión (Morrison *et al.*, 1985). Además, el daño epitelial causado por el microorganismo predispone a infecciones secundarias que complican el cuadro clínico y el control de procesos respiratorios más graves, como los causados por *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Yagihashi *et al.*, 1984), *Haemophilus parasuis* (Ciprian *et al.*, 1988) y *Pasteurella multocida* (Amass *et al.*, 1994).

Las pérdidas económicas asociadas con esta enfermedad son frecuentemente el resultado de una interacción compleja entre el *Mycoplasma* y otras infecciones bacterianas, mal manejo sanitario y malas condiciones ambientales. Algunos estudios muestran que más del 90% de las piaras en el mundo entero están infectadas con neumonía enzoótica porcina, haciendo de ésta una de las enfermedades porcinas más prevalentes y costosas (Clark, 1999).

La neumonía por micoplasma en cerdos es una enfermedad respiratoria de alta morbilidad y baja mortalidad (Stipkovits, 1995), *Mycoplasma hyopneumoniae* es un microorganismo de elevada prevalencia y de distribución mundial (Ross, 1986). Produce gran impacto económico en la producción porcina por la disminución en la velocidad de crecimiento, reducción de la eficiencia alimenticia (Hill *et al.*, 1992; Copes *et al.*, 1995) desuniformidad del lote (Camacho y Calle, 2003) y baja ganancia de peso media diaria (Morrison *et al.*, 1985).

Estudios realizados, indican que la inmunidad pasiva que reciben los lechones de sus madres no vacunadas, los protegen hasta las 6 semanas de edad u 8 semanas si son vacunadas; posteriormente, los niveles de anticuerpos descienden a medida que los animales pasan a las unidades de crecimiento y acabado (Armstrong, 1983), quedando en un periodo de susceptibilidad. Ante estas circunstancias se han desarrollado vacunas que además de brindar cierta protección al animal tratan de satisfacer las necesidades de los productores.

En la mayoría de granjas porcinas de Lima no se vacuna contra *Mycoplasma hyopneumoniae* y si lo hacen, utilizan bacterinas de dos dosis y con diferentes esquemas de vacunación en las cuales se puede o no incluir la vacunación de madres gestantes. El presente trabajo tiene por objetivo evaluar el efecto de dos programas de vacunación sobre la ganancia de peso y el título de anticuerpos durante todo el período productivo en porcinos procedentes de madres no vacunadas de una granja positiva a *Mycoplasma hyopneumoniae*.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Antecedentes

Esta enfermedad era considerada anteriormente como una Pasteurelosis, siendo descartada en 1907 por Huytra; ya por los años 30, se pensó que este microorganismo podría ser un virus, por lo que a la enfermedad se le denominó “Gripe de los lechones” confundiéndose con la Influenza Porcina, pero esto fue desestimado por Pullar en 1948, quien caracterizó la neumonía como “crónica” (Stipkovits, 1995; Ross, 1986; Plonart y Bickhardt, 2001).

Se decía que era causada por un virus ya que ni las penicilinas ni las sulfas lo afectaban, por ello se le denominó a la enfermedad “neumonía viral de los cerdos”, este punto de vista fue puesto en duda por Whittlestone en 1960 quien sugirió que el agente causal era un micoplasma (Goodwin, 1984). Desde hace muchos años se conoce a *Mycoplasma hyopneumoniae* como causante de una enfermedad en cerdos caracterizada por un cuadro neumónico; es así que, en 1965 de manera simultánea Mare y Switzer (Estados Unidos) y Goodwin et al (Inglaterra) fueron los primeros en aislar este microorganismo de pulmones neumónicos, pudiendo reproducir la enfermedad experimentalmente. Posteriormente, surgió una discusión por la nomenclatura de dicho agente, ya que, en Inglaterra lo denominaron *Mycoplasma suis pneumoniae* y en Estados Unidos *Mycoplasma hyopneumoniae*; luego de demostrarse que se había aislado el mismo agente se le dio prioridad al segundo nombre, quedando registrado como *Mycoplasma hyopneumoniae* (Ross, 2000).

## 2.2 Etiología

*Mycoplasma hyopneumoniae* pertenece taxonómicamente a clase Mollicutes. Es un organismo procariota, estos no tienen pared bacteriana, por ello son pleomórficos y en concreto, *M. hyopneumoniae*, tiene un diámetro medio de 0,2 µm, adopta formas que varían desde esférica a ovoide o piriforme, e incluso helicoidal, y está rodeado por una membrana simple de unos 10 nm de grosor (Poveda *et al*, 2002).

Es un organismo de difícil cultivo y su crecimiento es muy pobre; en el tracto respiratorio del cerdo puede encontrarse de forma habitual *M. hyorhinis*, microorganismo de fácil crecimiento y frente al *M. hyopneumoniae* es muy mal competidor. El cultivo se realiza en medios complejos y por la razón antes expuesta, se recomienda la adición de un antisuero frente a *M. hyorhinis*. En la actualidad, se emplea para su aislamiento el medio de Friis modificado, por la adición de 8,1 % de suero de cerdo para mejor adaptación del micoplasma al cultivo. Su primer aislamiento sólo se consigue en medios líquidos. En el medio líquido de Friis crece lentamente, entre 3 y 30 días de incubación. La rapidez de crecimiento es mayor si la incubación en medio líquido se realiza a 37° C, en anaerobiosis y agitación continua (Poveda *et al*, 2002).

Normalmente el cultivo inicial se subcultiva en medio líquido para luego pasarlo a un medio de cultivo sólido y se recomienda incubar en atmósfera con un 5-10% de dióxido de carbono. Las colonias, en medio sólido, se hacen visibles hacia los 2 días de incubación y alcanzan un tamaño de 0,5-1 mm de diámetro entre los 4 y 7 días (Ross, 2000). Estas colonias se visualizan mal a simple vista y están desprovistas de protuberancia central. Por carecer de pared celular, la morfología de las colonias presenta la apariencia característica de “huevo frito”, con un crecimiento central en profundidad, probablemente a una leve actividad proteolítica, y una zona periférica translúcida, debida al crecimiento sobre la superficie (Poveda *et al*, 2002). Requiere para el crecimiento colesterol y fermenta la glucosa, obteniendo adenosina trifosfato (ATP) por la vía de la glucólisis; además la ATPasa se asocia con la membrana celular de todos los micoplasmas (Wolfgang *et al*, 1997); no fermenta la arginina ni la urea. La rapidez de crecimiento es mayor si la incubación en medio líquido se realiza a 37°C, en anaerobiosis y agitación continua (Andrada *et al*, 2001).

Algunas proteínas de *M. hyopneumoniae* se han identificado que podrían estar involucradas en la patogenia de este agente, entre ellas se encuentran: la p97 principal lipoproteína de superficie asociada a la virulencia (Janke, 1997; Zhang *et al*, 1995); la

p102 proteína accesoria a la p97 interviene también en el mecanismo de adhesión junto con la p110 (Chen *et al*, 1998; Hsu y Minion, 1998).

La p36 proteína citosólica con actividad de lactato deshidrogenasa (Frey *et al*, 1994; Haldimann *et al*, 1993); las p46, p65 y p74 proteínas de membrana; la p72 involucrada en el sistema de la enzima transferasa (Chung *et al*, 2000); la p42, p60 y p70 son proteínas que pertenecen al grupo de las “Heat Shock Proteins” (Hsp) las cuales mantienen la integridad del agente y su función celular en situaciones de estrés (Chou *et al*, 1997; Sherm *et al*, 2002). Otras proteínas de membrana como la p7413, la p7048, la p6523, la p467 y la p4026, son proteínas específicas que podrían usarse en el diagnóstico de este agente (Andrada *et al*, 2001). Las proteínas p36 y p46 son proteínas con determinantes antigénicos específicos de *M. hyopneumoniae* no encontradas en otros micoplasmas comunes en los cerdos (Caron *et al*, 2000b).

## 2.3 Epidemiología

La transmisión de *Mycoplasma hyopneumoniae* es lenta y principalmente por contacto nasal entre animales (Done, 1997). En un estudio epidemiológico se encontró que el contacto directo era la única variable significativamente asociada a la seroconversión (Morris *et al.*, 1995).

Si el contacto directo es la única ruta de transmisión, la enfermedad sólo podría entrar en una granja por la introducción de animales infectados (Goodwin, 1985) o animales latentemente infectados (Goodwin, 1984). Se han propuesto tres mecanismos por los que la infección de *M. hyopneumoniae* se mantiene en una granja (Ross, 1986): transmisión de madres infectadas a lechones; de lechones infectados a otros no infectados en las parideras y salas de transición; y transmisión de animales de cebadero a otros más jóvenes que entran en dichas instalaciones.

El *M. hyopneumoniae* resiste 30 minutos a 45°C, pero a 50°C se destruye en 5 minutos. Soporta la liofilización y temperaturas de -180°C. Desaparece del pelo y ropa en 48 horas en ambiente seco. Sobrevive bien en el agua de lluvia, hasta 17 días, a bajas temperaturas (2-7°C), lo que explicaría la transmisión aerógena por aire húmedo (Andrada *et al*, 2003).

Estudios de campo, implicaron al cerdo portador como la principal fuente de infección (Ross, 2000); pudiendo afectar a cerdos de todas las edades, siendo más severa en los jóvenes (Done, 1997). Se sugiere que todos los grupos etáreos son igualmente susceptibles a neumonía micoplásmica, sin embargo el pico de prevalencia de la infección parece darse durante el crecimiento y engorde (Wallgren *et al*, 1993; Yagihashi *et al*, 1993; Morris *et al*, 1995).

No existen otros hospedadores conocidos de este microorganismo, aunque también se ha encontrado infección y brotes de neumonía en rebaños cerrados y rebaños libres sin introducción de animales nuevos (Blood *et al.*, 2000).

El curso frecuentemente subclínico en una explotación puede deberse a la escasa inmunidad en las cerdas más viejas, las cuales les transmiten anticuerpos a sus crías a través del calostro, lo que ofrece protección pasiva (Plonart y Bickhardt, 2001).

La infección se origina normalmente cuando los lechones que poseen anticuerpos maternos son trasladados a las naves de engorde después del destete. Así, los lechones pasan inicialmente protegidos a sus corrales, pero al perderlos quedan expuestos a los aerosoles contaminados con *Mycoplasma hyopneumoniae* procedentes de los animales de mayor edad que permanecen en la nave (Andrada *et al*, 2001).

Esta enfermedad es difícil de controlar y su incidencia es mayor en la crianza de tipo intensiva, (Done, 1991); se presenta mayormente en granjas con alta densidad poblacional, ventilación inadecuada y niveles elevados de amoníaco en la atmósfera (Ibarra *et al.*, 2000), aparece con mayor frecuencia en invierno, por las condiciones de humedad (Otto, 1991)

También se ha señalado que la temperatura y la humedad modifican la capacidad de penetración del microorganismo a los pulmones, porque alteran el tamaño de las partículas de aerosoles infectadas y el mecanismo protector de las vías respiratorias, además de alterar la sedimentación de dichas partículas. Los cerdos de crianza artesanal al ser sometidos a fluctuaciones de temperatura ambiental, corrientes frías y mala nutrición son por lo tanto más propensos a sufrir esta enfermedad (Ibarra *et al.*, 2000).

En sistemas de producción “todo dentro todo fuera” *M. hyopneumoniae* se transmite de las madres a sus lechones durante el período de lactación (28 días), mientras que en sistemas de “Destete Segregado Temprano (DST)”, se evita la transmisión cuando los

lechones se destetan antes de los 15 días de edad. En general, la edad en que los lechones se infectan a través de sus madres varía de granja a granja (Clark, 1997).

Los signos de enfermedad se observan cuando los lechones tienen 6 semanas de edad (Ross, 1986), pero la severidad de la enfermedad es mayor cuando los lechones se infectan a las 8 semanas de edad (Thacker, 1999). La mayor incidencia clínica y patológica de la enfermedad, ocurre luego del destete y en la mayoría de los casos, continúa durante el período de crecimiento o hasta la edad comercial de los animales (Gardner y Hird, 1990).

El 80% de los brotes parecen estar asociados a la introducción y mezcla de cerdos de comercio y el 20% estaba asociado con la introducción del stock de cría adulto (Ross, 2000). En los rebaños infectados, la tasa de mortalidad es de 1 a 5%, menor que la de morbilidad, la que alcanza su nivel más alto (40 a 60%) a los 4 a 6 meses de edad, declinando posteriormente (Stipkovits, 1995).

Las lesiones típicas de neumonía micoplásmica ocurren entre 30 a 80% de cerdos con peso al beneficio; datos más recientes reportan que el 100% de piaras están afectadas con neumonía micoplásmica; variando la prevalencia entre 38 a 100% en diferentes países. Young *et al* (1983) encontraron que un 60% de animales de diferentes piaras presentaban anticuerpos fijadores del complemento (FC), en especial en cerdos cerca al beneficio.

### **2.3.1 Transmisión**

Su transmisión es principalmente por contacto nasal (Done, 1997); también se han propuesto otras vías de transmisión, como fomites (Goodwin, 1984) y vía aerógena (Goodwin 1985, Thomsen *et al.*, 1992), pero ninguna de estas dos últimas vías había sido demostrada experimentalmente; pero, Staerk *et al* (1997) mediante una técnica de PCR anidada lograron detectar el agente en muestras de aire, encontrando que este agente se hacía más prevalente en el aire, en granjas con casos agudos de la enfermedad, a diferencia de granjas con casos crónicos, donde las muestras de aire resultaron negativas, aunque esto no fue determinante, debido a que el microorganismo, no se distribuye uniformemente en una misma granja; además, se halló más prevalencia del agente en granjas donde había mayor presencia de tos en

los animales. Por lo tanto, la transmisión aérea es un mecanismo para la reinfección de piaras libres de *Mycoplasma hyopneumoniae* (Staerk *et al.*, 1997).

Los lechones se infectan por las secreciones respiratorias de la madre, apareciendo la infección en estos después de las 4 a 6 semanas de vida, ya que durante las primeras semanas están protegidos por los anticuerpos maternos recibidos (Kobisch y Friis, 1996).

Es menos probable que las cerdas mayores transmitan la enfermedad a su descendencia que las cerdas más jóvenes. Siendo en su mayoría las hembras primíparas las que excretan *M. hyopneumoniae*, infectando así directamente a su descendencia; siendo atribuible a la baja inmunidad contra el agente, de estas cerdas (Andrada *et al.*, 2003).

A pesar de que la transmisión puede ocurrir entre cerdos del mismo corral, esto no siempre sucede, incluso entre compañeros del mismo corral mezclados entre sí (Ross, 2000). En un estudio epidemiológico se encontró que el contacto directo era la única variable significativamente asociada a la seroconversión (Morris *et al.*, 1995).

### **2.3.2 Influencia en parámetros productivos**

*Mycoplasma hyopneumoniae* causa un impacto negativo en los parámetros productivos de los cerdos de engorde, disminuyendo el promedio de ganancia diaria y la eficiencia de conversión (Morrison *et al.*, 1985) produciendo desuniformidad y prolongando los días de salida al mercado ocasionando que las instalaciones sean ocupadas por más tiempo, reduciendo aún más el rendimiento, incrementando los costos y reduciendo los márgenes de ganancia (Valdivia, 1999).

La tasa de crecimiento en cerdos expuestos a hembras infectadas llega a reducirse hasta en 15,9% y la conversión alimenticia disminuye en 13,8% (Ross, 2000). En un estudio de campo realizado en cerdos de engorde, el efecto negativo en la ganancia diaria de peso por una infección natural con *M. hyopneumoniae* se estimó en 24 gramos o 2.9% del peso corporal (Tuovinen *et al.*, 1994); en el Perú se reportó una disminución en la ganancia de peso de 10–15% (Valdivia y Calle, 1999). Además, las infecciones con *M. hyopneumoniae* adquiridas tempranamente durante la crianza y fortalecidas por factores medioambientales y de manejo disminuyen la ganancia de peso en los porcinos (Rautiainen *et al.*, 2000).

Las lesiones presentes en el momento de la matanza pueden relacionarse en sólo un 9–27% de la variación en aumento de peso promedio diario; sugiriendo que el 20–90% restante podría deberse a factores tales como ambiente, alimento, genética y sistemas de manejo.

Pijoan y colaboradores determinaron que por cada 10% de lesión pulmonar existe una disminución del 5% en la ganancia diaria de peso (Fuentes, 2000) mientras que, Scheidt *et al.* (1990) reportan que por cada 10% de pulmón neumónico se disminuye en 37.3 gramos la ganancia de peso. El impacto en costos de las lesiones neumónicas debe calcularse a través de un minucioso examen en el camal.

### **2.3.3 Efectos perjudiciales sobre el sistema respiratorio**

*Mycoplasma hyopneumoniae* es el microorganismo considerado como el patógeno respiratorio de naturaleza no vírica con mayor importancia económica en porcino. La presencia de *Mycoplasma hyopneumoniae* se restringe al tracto respiratorio. Principalmente, se centra en los pulmones y raramente se aísla de la cavidad nasal (Done, 2002). Debido a este neumatropismo, las condiciones que afectan directamente al sistema respiratorio, favorecen en gran medida el desarrollo de la enfermedad. Tras la exposición, se produce la colonización en el tracto respiratorio (tráquea, bronquios y bronquiólos), provocando varios efectos:

- Alteraciones en la superficie de las células epiteliales
- Interferencia con los mecanismos que secretan células bactericidas
- Modificaciones del movimiento de los cilios responsables del aclaramiento mucociliar

El poder patógeno de *Mycoplasma hyopneumoniae* se basa en su unión a los cilios del tracto respiratorio y su posterior destrucción. Este mecanismo priva al huésped de un importante sistema defensivo del tracto respiratorio, ya que la pérdida de cilios resulta en una disminución de la eliminación de partículas inhaladas, patógenos y fluidos pulmonares. Del mismo modo, se compromete la barrera mecánica contra los patógenos invasores y permite que patógenos secundarios como *Pasteurella*

*multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, y *Salmonella choleraesuis* infecten los pulmones (Done, 2002).

Aunque sea de menor importancia, *Mycoplasma hyopneumoniae* también actúa como supresor de la respuesta inmune. Los cerdos infectados con dicho microorganismo tienen alterada la función de los macrófagos y se ven predispuestos para infecciones por otros microorganismos.

#### **2.3.4 Problemática real a nivel de campo**

La prevalencia de la neumonía enzoótica es muy elevada en toda la geografía mundial. Así, hallamos explotaciones con una incidencia muy alta en casi todos los países que poseen una cabaña porcina importante. Inspecciones llevadas a cabo en varios países muestran que las lesiones típicas de neumonía enzoótica puede observarse en el 30-95% de los cerdos sacrificados, mientras que el 60-99% de las granjas puede ser positiva a *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Diversos estudios realizados para evaluar lesiones pulmonares en mataderos españoles, han confirmado que incluso un 70% de los cerdos presentan lesiones pulmonares más o menos graves debidas a *Mycoplasma hyopneumoniae* en muchas granjas (Zimmermann, *et al.*,1989).

La neumonía enzoótica es una enfermedad crónica con una alta tasa de morbilidad y una baja tasa de mortalidad. No obstante, tiene un grave impacto sobre los parámetros productivos en los cerdos de engorde. Así, el principal problema de *Mycoplasma hyopneumoniae* es la merma en el rendimiento productivo de la granja. Principalmente, se observa una reducción del crecimiento de los animales, una menor uniformidad en el desarrollo de las camadas, un aumento en la tasa de conversión de pienso y una disminución de la ingesta de alimento. Por otro lado, el daño epitelial causado por el microorganismo predispone a infecciones secundarias que complican el cuadro clínico y el control de procesos respiratorios más graves.

En ausencia de otros patógenos, *Mycoplasma hyopneumoniae* puede no causar signos clínicos. El cuadro se complica cuando el micoplasma se asocia a otros patógenos respiratorios formando el denominado Complejo Respiratorio Porcino. Este

complejo, en el que intervienen tanto virus (virus enfermedad de Aujeszky, virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV), virus de la influenza porcina, circovirus porcino (tipo 2) como otras bacterias (*Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, etc), ha emergido en la mayoría de países a pesar de las estrategias adoptadas en granjas de elevado estado sanitario y a pesar de la disponibilidad de vacunas para la mayoría de estas enfermedades.

Los problemas asociados a la neumonía enzoótica que observamos con mayor frecuencia y que afectan en mayor o menor medida a la economía de la granja son los siguientes: sintomatología respiratoria típica y lesiones pulmonares, infecciones secundarias, engorde más lento e ineficiente, disminución de la ganancia media diaria de peso, más días de ocupación por cerdo, más movimientos de cerdos, incremento del coste de alimentación por cerdo, reducción de la eficiencia alimenticia: mayor tasa de conversión del pienso, lotes poco uniformes, aumento de los costes de manejo y mano de obra, incremento de los costes de medicación, penalizaciones en el matadero, reducción del valor de la canal.

Así, el problema de la neumonía enzoótica no es que cause mortalidad en los animales, sino que debido a las lesiones pulmonares que provoca en los animales infectados, los índices productivos en los cerdos de engorde se ven alterados (Kobish, *et al.*, 1993).

## **2.4 Signos clínicos y Lesiones**

El principal signo clínico es una tos crónica, de tipo improductiva; el comienzo de la enfermedad es gradual y la tos continúa durante unas semanas o incluso meses, aunque algunos cerdos afectados presentan poca tos o no la presentan. La intensidad de la tos es con frecuencia máxima en cerdos en crecimiento-acabado (Ross, 2000); se puede exacerbar por condiciones de estrés y/o por infecciones secundarias, pudiendo llegar estas complicaciones a originar la muerte de los animales afectados (Andrada *et al.*, 2001).

La tos provoca acúmulo de secreción bronquial producida durante el descanso e irritación provocada por la respiración forzada sobre el epitelio bronquial. En el cuadro sin complicaciones no se presenta fiebre, ni disnea, y cuando éstas se presentan suelen ser el resultado de una infección secundaria, a causa de otras bacterias (Plonart y Bickhardt, 2001). Además, pueden aparecer otros signos como retraso en el crecimiento, pelaje hirsuto y opaco con disminución de los índices de conversión alimenticia, pudiendo éstos ser los únicos indicadores de presencia de neumonía micoplásmica (Andrada *et al.*, 2001). La mayoría de cerdos con neumonía micoplásmica no evidencian malestar pero su desarrollo es menor, pudiendo haber enanismo, aunque el apetito sea normal (Ross, 2000).

La caracterización adecuada de los varios estadios degenerativos de la enfermedad, es necesaria, debido a que las infecciones secundarias con bacterias, virus y parásitos, son comunes en casos de enfermedad en situaciones de campo, pudiendo alterar las lesiones, resultando en severos cambios morfológicos (Roberts *et al.*, 1962). Animales con infecciones bacterianas secundarias pueden manifestar inapetencia, tos constante, fiebre, postración y respiración dificultosa (Ross, 1999).

*Mycoplasma hyopneumoniae* no invade los tejidos, ni el parénquima pulmonar, simplemente reside en la superficie del epitelio; causando desciliación y pérdida del movimiento ciliar; por tanto, una inflamación en el tejido circundante (Blood *et al.*, 1999); las lesiones típicas de micoplasma consisten en zonas demarcadas de consolidación en los lóbulos craneoventrales que varían de un color rojo oscuro a púrpura en casos agudos, tornándose gris en casos crónicos, resultado del proceso inflamatorio iniciado por el animal (Ross, 2000).

*Mycoplasma hyopneumoniae* por si solo produce lesiones neumónicas que probablemente no afectarían más del 10% del total pulmonar. La intensidad de la lesión se incrementará por deficientes condiciones de manejo, humedad, elevada concentración de amoníaco o polvo en el aire, gérmenes oportunistas, contenido deficiente de proteína, minerales y vitaminas en el alimento. Cualquiera de estos agentes agravarán los síntomas clínicos e incrementarán las lesiones en el animal, pudiéndose incrementar el porcentaje de lesión pulmonar (Fuentes, 2000)

La baja frecuencia de lesiones neumónicas típicas de neumonía micoplásmica se debe a que, en caso de los animales de granjas tecnificadas, estos alcanzan su peso de beneficio a los 5 meses de edad en promedio. En cambio en animales de crianza no

tecnificada, requieren de 8 a 9 meses, tal como lo mencionan Blood y col (1999), la prevalencia de lesiones neumónicas en explotaciones intensivas alcanza su pico máximo a los 60 a 65 Kg de peso corporal, y luego declina constantemente hasta un nivel muy bajo, por lo que la edad y el peso son factores que se deben tomar en cuenta.

Histológicamente, las lesiones tempranas consisten en pequeñas acumulaciones de neutrófilos en la luz y alrededor de las vías aéreas, conforme progresa, aumenta el número de linfocitos en los tejidos; los alvéolos pueden contener edema eosinófilo y grandes cantidades de células mononucleares, septales y polimorfonucleares. En lesiones más avanzadas existe una extensa proliferación del tejido linforreticular en áreas perivasculares y peribronquiolares (Ross, 2000).

En un estudio realizado por Rautiainen (2001) se encontró que las lesiones pulmonares fueron más prevalentes en cerdos que desarrollaron menor cantidad de anticuerpos en el periodo de engorde. La reducción del porcentaje de lesiones pulmonares en animales vacunados alcanza el 66% según Goodwin (1984) y 57.4% según Hannan *et al.* (1997). Además, su incidencia es mayor en los lechones de 3 a 5 meses de edad.

En Lima, Torres (1992), al evaluar las lesiones pulmonares que determinan el decomiso del pulmón de cerdo, encontró que de 100 pulmones de animales examinados al matadero existían lesiones que se podían atribuir a neumonía micoplásmica en una frecuencia de 11%.

## 2.5 Inmunidad

Debido a que *M. hyopneumoniae* se encuentra exclusivamente en la superficie de las vías respiratorias, adherido a los cilios, es difícil estimular el sistema inmune, al igual que provocar una respuesta adecuada para que los productos de la respuesta inmunitaria alcancen niveles suficientes para eliminar el microorganismo (Calsamiglia, *et al.*, 1999).

*M. hyopneumoniae* posee vellosidades en su capa externa y una cápsula en la superficie que lo protegen de las células del sistema inmune como los neutrófilos y macrófagos; pudiendo evadir el reconocimiento por el sistema inmune de memoria, ya que presenta proteínas de superficie o lipoproteínas que incrementan su habilidad de adherirse a las células hospedadoras; además, puede desviar la respuesta inmune hacia una respuesta menos efectiva, lo que puede resultar en alteración de la respuesta a otros patógenos (Thacker, 2001).

Otros mecanismos también están involucrados en la protección del agente del sistema inmune, para evitar su destrucción; incluyendo, la activación de varias células blanco del sistema inmune como linfocitos y macrófagos, previniendo que los linfocitos respondan a sustancias que normalmente la activan (inmunosupresión) y liberando sustancias (citoquinas) que adicionalmente activan las células, evitando el desarrollo de mecanismos específicos de eliminación (Thacker, 1997).

La reacción inmune local con frecuencia provoca daños adicionales porque los complejos inmunitarios formados pueden provocar reacciones autoinmunes en los tejidos bronquiales y pulmonares (Plonart y Bickhardt, 2001).

### **2.5.1 Inmunidad Humoral**

La respuesta inmunológica inducida por el *Mycoplasma hyopneumoniae* es de tipo humoral principalmente produciéndose IgM e IgA, seguidas por IgG, los anticuerpos fijadores del complemento, básicamente IgM se encuentran muy temprano (Carter, 1991). La inmunidad local, especialmente la IgA secretora, se considera importante en la infección por este agente (Blood *et al.*, 1999); siendo esta inmunoglobulina predominante en el tracto respiratorio alto del cerdo, aunque con muy bajos niveles.

Se ha demostrado que en una población existe variación biológica en la fuerza de la respuesta inmune humoral entre individuos con igual estímulo antigénico (Stevenson, 1999), además no existe correlación entre protección y nivel de anticuerpos séricos (Thacker, 1999b), pero existe asociación de la inmunidad humoral contra *M. hyopneumoniae* y la resolución de neumonía (Cornaglia, 2002).

La inmunidad pasiva juega un papel importante en la enfermedad, en el momento de presentación y severidad de la infección (Thacker, 1999b). Esta inmunidad materna puede inhibir el desarrollo de las respuestas local y sistémica, demorando así el desarrollo de la neumonía micoplásmica (Thacker, 2001), teniendo un mínimo o nulo impacto en el nivel de infección (Thacker y Thacker, 2001).

Durante la gestación, los anticuerpos protectivos son transferidos de la sangre a la glándula mamaria durante el último mes (Wallgren *et al.*, 1998). Los niveles de anticuerpos contra *M. hyopneumoniae* en lechones se relacionan estrechamente con los de su madre; es así, que marranas viejas (más de 5 partos) tienen hasta 3.3 veces mayor cantidad de anticuerpos que las cerdas jóvenes (Rautiainen, 2001), siendo

importante por ello, el número de partos y la historia de la madre al interpretar los resultados, por lo que inmunizar a las madres incrementaría hasta tres veces más el título de anticuerpos en sus lechones independientemente del número de partos (Clark, 2000).

Los anticuerpos calostrales contienen altos niveles de inmunoglobulinas, predominando la IgG; los lechones absorben los anticuerpos principalmente las primeras seis horas y el cierre intestinal para la absorción de inmunoglobulinas intactas ocurre a las 18 horas (Bazer *et al.*, 2001). La vida media de los anticuerpos adquiridos pasivamente es de 16 días, disminuyendo entre los 30 y 63 días de edad, dependiendo de la concentración inicial de los mismos, variando entre las diferentes granjas (Blood *et al.*, 1999).

Los anticuerpos maternos tienen un impacto mínimo en el nivel de infección (Thacker y Thacker, 2001) y pueden proveer protección parcial contra el desarrollo de lesiones pulmonares hasta las primeras seis semanas de vida (Jayappa *et al.*, 2001; Desrosiers, 2001), pero posiblemente no previenen un reto tardío (Burch, 2003).

En un estudio realizado en el Perú, se pudo ver que la persistencia de la inmunidad materna alcanzó las 8 semanas de edad en el 43.3% de los animales; el mayor porcentaje de animales infectados seroconvirtieron a las 12 semanas de edad, indicando que la actividad del micoplasma se inició al final de la etapa de recría, alrededor de las 9 semanas de edad (Torres, 2003); encontrándose esto dentro de los límites establecidos por Joo *et al.* (1988) que estableció el tiempo de seroconversión entre las 10 – 16 semanas de edad, sugiriendo que la infección natural ocurre durante la etapa de recría a las 4 – 12 semanas de edad.

Se desconoce que induce la seroconversión contra *M. hyopneumoniae*, pero es probable que ocurra cuando el número de estos microorganismos alcance niveles críticos, o cuando el daño en el tracto respiratorio causado por otros patógenos exponga al agente al sistema inmune (Thacker, 2001).

La seroconversión se observa comúnmente unos días después de la infección, pudiendo darse después de unas semanas (León *et al.*, 2001). La tos se presenta al momento de la seroconversión; además, las lesiones macroscópicas de neumonía están asociadas a la seroconversión; Stijar *et al.* (1996) demostraron, con el uso de radiografías de tórax y monitoreando anticuerpos contra *M. hyopneumoniae*, que el pico de severidad de las lesiones pulmonares está asociado al momento de la

seroconversión, siendo su mayor índice entre los 3 y 4 meses de edad (Blood *et al.*, 1999).

El contacto directo entre cerdos de 9 a 11 semanas con cerdas seropositivas produce seroconversión frente al microorganismo, primero a los 21 días siendo mas frecuente que ocurra aproximadamente a las 11 semanas después del contacto (Blood *et al.*, 1999).

En infecciones experimentales, la seroconversión tiene lugar entre las 2 y las 5 semanas después de la inoculación (Suter *et al.*, 1985), o a las 9 semanas en animales en contacto (Armstrong *et al.*, 1983). En casos de infección natural, el tiempo de seroconversión parece incluso más tardío y variable (Sitjar *et al.*, 1996; Calsamiglia *et al.*, 1999).

En infecciones a las seis semanas de edad los anticuerpos aparecen a las tres semanas postinfección, alcanzando el pico máximo a las 8 semanas y luego descienden progresivamente hasta desaparecer al año después de la infección. En animales infectados a las dos semanas de edad, aparecen anticuerpos a las dos semanas seguidas a la infección, siendo además mayor la tasa de anticuerpos que cuando se infectan a las 8 semanas.

La inmunidad activa adquirida artificialmente protege a los cerdos y aumenta su promedio de ganancia diaria de peso comparado con los animales que no reciben la vacuna, además de reducir las lesiones pulmonares causada por este agente (Siugzdaite y Garlaite, 2002).

La inducción de anticuerpos séricos por vacunas tiende a ser lenta, la seroconversión suele ocurrir dos semanas postvacunación; estos niveles de anticuerpos séricos declinarán poco después, haciéndose los porcinos seronegativos aproximadamente entre las 4 y 6 semanas postvacunación (Thacker, 1999a). Además, estos niveles séricos postvacunales, no se correlacionan con un alto grado de protección, ni con una mayor duración de la misma; incluso varía de uno a otro individuo (Surprenant, 2001).

### 2.5.2 Inmunidad celular

*Mycoplasma hyopneumoniae* incrementa el nivel de citoquinas proinflamatorias (macrófagos), como las IL-1( $\alpha$  y  $\beta$ ), IL-6 que inducen una inflamación más amplia y daño tisular (Thacker *et al.*, 1999). Aparentemente, esto se relaciona con el aumento de calcio producto de la infección de las células epiteliales ciliadas (Thacker, 1999b). Estas citoquinas son producidas por macrófagos y monocitos e inducen una inflamación local; el mecanismo por el cual activa estas células es desconocido (Thacker, 2001).

Varias proteínas de superficie sobretodo lipoproteínas, juegan un rol sobre la activación de los macrófagos y linfocitos. Inversamente, el organismo puede suprimir la reactividad del linfocito, pudiendo ligar no específicamente inmunoglobulinas, y elaborar proteasas capaces de dividir a la IgA (Janke, 1997).

*Mycoplasma hyopneumoniae* desvía la respuesta inmunológica de tipo T helper 1 (Th1), en el cual los macrófagos se activarían para fagocitar y destruir a los microorganismos, hacia una respuesta predominantemente T helper 2 (Th2), la cual es probablemente menos efectiva en controlar y eliminarlo, pudiendo resultar en la alteración de la respuesta inmunológica a otros patógenos (Thacker, 2001). Esto podría deberse, a que *M. hyopneumoniae* estimula la producción de citoquinas mediadas por células T, como IL-2, IL-4 e IFN  $\gamma$ , que tienen aspectos amplificadores de linfocitos y afectan el balance entre las subpoblaciones de Th1 y Th2 (Rottem y Naot, 1998).

Este agente además, estimula la producción de Factor de Necrosis Tumoral (TNF- $\alpha$ ) en los fluidos bronquioalveolares, así como de la producción de Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) específico a *M. hyopneumoniae* (Thacker *et al.*, 2000).

Se ha comprobado que los porcinos expuestos y no inmunizados presentan una mayor concentración de TNF- $\alpha$  en el fluido bronquioalveolar, en comparación con los animales expuestos e inmunizados (Thacker y Thacker, 2001). Además, la inmunización activa con bacterina estimula respuestas en las células linfoides del bazo, nódulos linfoides y sangre periférica de cerdos vacunados, aumentando las células CD8+ (supresoras) en órganos linfoides periféricos, células CD4+ (activadoras) en los nódulos linfoides bronquiales y grandes cantidades de células

CD16+ (activador de células asesinas naturales) en lavados bronquioalveolares (Bhogal *et al.*, 1992).

## 2.6 Fisiopatología

El proceso de virulencia de los micoplasmas es complejo e involucra la unión/colonización, citotoxicidad, competición por el sustrato, la evasión y modulación de la respuesta inmune del hospedador (Ross, 2000).

Estudios realizados usando hibridización **in situ**, detectaron la presencia del agente en la superficie del epitelio celular de bronquios y bronquiolos pero no en el citoplasma de estas células, lo que contribuye a pensar que *M. hyopneumoniae* es una bacteria extracelular; aunque una íntima adherencia entre el agente y el epitelio es importante (Kwon *et al.*, 2002). Su presencia sobre la mucosa del aparato respiratorio disminuye en el curso de la enfermedad, llegando prácticamente a desaparecer en las fases más avanzadas de la misma, pudiendo persistir o potenciarse su permanencia cuando está asociado a otras bacterias secundarias (Andrada *et al.*, 2003).

El periodo de incubación es en promedio de 10–16 días en condiciones naturales, sin embargo, se ha encontrado una variación considerable en la duración (Ross, 2000); dependiendo de la exposición de los animales susceptibles y de la virulencia de la cepa comprometida, desarrollándose lesiones pulmonares evidentes a partir de los 7 a 10 días después de la infección (Andrada *et al.*, 2001). El inicio de la enfermedad probablemente dependa de la intensidad de la infección en las superficies de las mucosas traqueal y bronquial. La enfermedad se disemina lentamente y la manifestación clínica puede darse entre los 3 – 6 meses (Ross, 2000).

*Mycoplasma hyopneumoniae* coloniza la superficie de las células ciliadas de la tráquea, bronquios y bronquiolos de los porcinos, sin invadir las células epiteliales (Amanfu *et al.*, 1984; Ross, 1992); además, su presencia en el tracto respiratorio alto, así como, en la cavidad nasal es transitoria (Thacker, 2001). Existe una íntima adherencia del microorganismo a los cilios durante la infección (Zhang *et al.*, 1990); que es de gran importancia en la patogenia de la enfermedad, ya que es el grado de adherencia es el que determina la patogenicidad de las diferentes cepas de *M. hyopneumoniae* (Andrada *et al.*, 2003).

Debido a que los micoplasmas carecen de pared celular, pili, adhesinas y otras estructuras extracelulares, la adherencia a las superficies mucosas por este microorganismo involucra estructuras externas a la membrana menos organizadas. En efecto, las adhesinas del micoplasma parecen estar como simples proteínas incrustadas dentro de la membrana. En algunos casos, las adhesinas parecen estar organizadas en dominios de unión en la superficie de la membrana (Razin y Jacobs, 1992).

Estudios “in vitro” e “in vivo” han demostrado que *M. hyopneumoniae* se adhiere sólo a la superficie de células ciliadas del tracto respiratorio, pero no a la superficie de las células no-ciliadas (Blanchard *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1990; Mebus y Underdahl, 1977; Zielinski y Ross, 1993). Estos datos indican que el epitelio ciliado del tracto respiratorio porcino tiene muchos receptores para el *M. hyopneumoniae*.

La adherencia de los micoplasmas a la superficie de la célula hospedadora puede interferir con los receptores de membrana o puede alterar mecanismos de transporte de la célula hospedadora. La invasión de *M. hyopneumoniae* produce cilioestasis y pérdida de cilios; la cilioestasis se debe a la disrupción por el agente en los canales de K<sup>+</sup> del epitelio ciliado bronquial despolarizando las membrana (Rottem, 2003); la pérdida de cilios podría deberse a un aumento en la concentración de calcio en el medio producido por micoplasma, comprometiendo así el mecanismo de defensa (Zhang *et al.*, 1994) además de una exfoliación mecánica de los cilios, debido al aumento en la actividad mucociliar. Este proceso se observa entre las 2 a 6 semanas postinfección, principalmente en la región media de la tráquea y en la superficie de los bronquios, posteriormente en los bronquiolos y lóbulos craneoventrales pulmonares (Blanchard *et al.*, 1992).

Las cepas patogénicas de *M. hyopneumoniae* incrementan el calcio en las células ciliadas de la tráquea, las cuales poseen un nivel basal de calcio; a diferencia de las cepas no patogénicas; lo cual indica que la unión a los cilios puede ser un prerrequisito para la inducción del flujo de calcio (Park *et al.*, 2002).

Se ha reconocido una proteína de membrana denominada p97 que se cree está involucrada en la adhesión del micoplasma a la superficie celular; y puede representar una proteína de variable tamaño encontrada normalmente en la superficie de los micoplasmas, sobretodo en la capa rizada (Rosengarten y Wise, 1991; Wise *et al.*, 1993; Yogev *et al.*, 1994) la mayor región antigénica parece encontrarse en la región terminal C de la proteína; aunque existen regiones putativas en otra regiones de la proteína. Aún se desconoce si la p97 se encuentra asociada a otras proteínas en la superficie del

micoplasma o se une directamente al glicocalix (Hsu *et al.*, 1997); esta variación antigénica es un mecanismo por el cual el micoplasma evade el sistema inmune (Zhang *et al.*, 1995). En un estudio realizado por Hsu y Minion(1998) encontraron que en la region1 (R1) de la secuencia de la p97 se encontraba la actividad de unión a los cilios (adherencia), esta región varía entre las cepas existiendo así cepas de baja, mediana y alta actividad adherente, además se sospecha que otras proteínas o factores independientes de la p97 están implicados en la adherencia a los cilios.

Otras proteínas que interviene en la patogénesis de *M. hyopneumoniae* son la p46 que estimula una respuesta inmune temprana en el cerdo y es específica de *M. hyopneumoniae* (Mori *et al.*, 1987; 1988) y la p36 que se ha caracterizado como una lactato deshidrogenasa (Haldimann *et al.*, 1993), la cual induce una respuesta inmune temprana en los cerdos infectados; además esta proteína se conserva bien entre las diferentes cepas de *M. hyopneumoniae* (Stipkovits *et al.*, 1991; Strasser *et al.*, 1991). La p36 aunque es antigénica, por ser una proteína citosólica y no de membrana, es débilmente inmunogénica y no desencadena una respuesta inmune eficiente (Caron *et al.*, 2000b).

*M. hyopneumoniae* una vez adherido a los receptores celulares estimula la proteína G activando la vía de la fosfolipasa C (PLC) incrementándose el calcio a través de la liberación de este en el retículo endoplasmático, sin embargo la adhesina p97 no aumenta la concentración de calcio, pero existe una proteína aun desconocida que media este efecto (Hsu y Minion, 1998).

La adherencia de los micoplasmas aparentemente produce un daño oxidativo a la membrana celular del hospedero por radicales peróxidos y superóxidos (Almagor *et al.*, 1986), además el contacto íntimo entre los micoplasmas y la membrana celular puede resultar en hidrólisis de los fosfolípidos de la célula catalizados por las potentes fosfolipasas presentes en algunas especies de micoplasmas. Esto podría desencadenar las señales de cascada específicas o liberar lisofosfolípidos citolíticos capaces de interrumpir la integridad de la membrana celular (Rottem, 2003).

Por poseer un genoma muy pequeño, *M. hyopneumoniae*, tiene opciones metabólicas de supervivencia y replicación limitadas; ya que en su proceso evolutivo han ido perdiendo la mayoría de genes involucrados en la biosíntesis de aminoácidos y cofactores; por ello, dependen del microambiente del hospedador para proveerse de

nutrientes, esta competencia por nutrientes o precursores biosintéticos puede alterar la integridad de la membrana celular del hospedero y su función celular (Rottem, 2003).

Estudios previos indican que algunos carbohidratos y glicoconjugados, incluyendo dextran sulfato, heparina, fucoidan, condroitín sulfato, mucina y laminina, inhiben la adherencia de los micoplasmas a las células ciliadas del tracto respiratorio porcino; determinando que estos glicoconjugados en la superficie ciliar están envueltos en la adherencia de los micoplasmas, aunque la naturaleza de los glicoconjugados no ha sido establecida (Zielinski *et al.*, 1990). Sin embargo, el más involucrado en esta adherencia es el dextran sulfato, además la laminina (glicoproteína de la membrana celular encargada del crecimiento celular, diferenciación y migración) unida a los receptores (La, Lb, Lc) en la superficie de las células ciliadas bloquea la adherencia de los micoplasmas a la superficie de los 3 receptores ciliares, aunque no interactúa con los micoplasmas directamente, sino con los receptores ciliares. El mecanismo por el cual *M. hyopneumoniae* daña las células ciliadas es aun desconocido (Zhang *et al.*, 1994).

Otro evento importante es la interacción del micoplasma con células linfoides, ya que las membranas de *M. hyopneumoniae* son mitogénicas para linfocitos porcinos in vitro (Messier y Ross, 1991; Kwon *et al.*, 2002), y los cerdos afectados con el microorganismo tienen alteraciones de la función del macrófago alveolar (Caruso y Ross, 1990) y están inmunosuprimidos.

Debido a su tamaño diminuto y plasticidad, adapta su forma, para conformarse en los contornos de la superficie de la célula hospedadora; su forma filamentosa con sus organoides de fijación terminal diferenciados, le permiten localizarse en las criptas y entre las microvellosidades y cilios, donde se encuentran protegidos de la fagocitosis (Wolfgang *et al.*, 1997).

Aunque el micoplasma burle la fagocitosis, parece interactuar con polimorfonucleares (PMN) y células mononucleares, suprimiéndolas o estimulándolas por una combinación de efectos directos e indirectos mediados por citoquinas tales como IL-1, IL-6 y TNF  $\alpha$ ; induce además la formación de quimioquinas como, la proteína 1-quimioatrayente de monocitos (MCP-1), proteína 1 $\alpha$ / $\beta$  inflamatoria de macrófago (MIP-1 $\alpha$ / $\beta$ ), factores estimulantes de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSFs), prostaglandinas y metabolitos activos de oxígeno y nitrógeno (Rottem y Naot, 1998). Estudios de hibridización in situ, revelaron que este agente puede infectar macrófagos pulmonares, siendo la destrucción de los mismos un indicador de su efecto patogénico (Maes *et al.*,

1996). Además, este agente con las moléculas liberadas en el plasma aumentan la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tipo I y II, y coestimula la adhesión celular de leucocitos y células endoteliales, induciendo reclutamiento y extravasación al sitio de infección y provocando daño tisular local (Rottem y Naot, 1998)

*M. hyopneumoniae*, utiliza varios mecanismos para eludir la respuesta inmune; puede variar su tamaño, a través de la adición o sustracción de repetidas secuencias genéticas, como estrategia para eludir la respuesta humoral (Neyrolles *et al.*, 1999); puede variar la expresión de las proteínas a nivel genético, a través de un mecanismo de expresión o no expresión de genes; es así como el mimetismo molecular y la variación antigénica evitan que el sistema inmune reconozca eficientemente al micoplasma (Thacker, 2004; Rottem y Naot, 1998).

*M. hyopneumoniae* no secreta directamente una sustancia tóxica que se difunda en el epitelio ciliar, sin embargo, una toxina puede ser la responsable de inducir la infiltración linfocítica peribronquial (Livingston *et al.*, 1972; Underdahl *et al.*, 1980), cambio en la afinidad de la lecitina al epitelio bronquial (Ackermann *et al.*, 1991) o alteraciones histoquímicas de la secreción de mucus por las células (DeBey *et al.*, 1992) en el cerdo infectado.

Para que el micoplasma produzca citotoxicidad debe haber un contacto directo de este con la células ciliadas (DeBey *et al.*, 1992); por consiguiente es posible que las adhesinas no sólo sean mediadoras de la adherencia, sino también parecen tener efectos patogénicos en las células ciliadas, por mecanismos aun desconocidos. Además, se sabe que la infección por *M. hyopneumoniae* eleva el nivel de calcio citosólico en los neutrófilos (DeBey *et al.*, 1993). Además, el efecto citopático sobre la célula no sólo se atribuye, a la capacidad de adhesión, sino también a una competencia metabólica entre el agente patógeno y la célula epitelial. La muerte celular consiguiente y su descamación provocan, como respuesta, una hiperplasia epitelial que intenta reparar la pérdida de las células (Kobisch y Friis, 1996).

Una vez que los cilios se han perdido, la protección de la mucosa disminuye y permite la adherencia a las partes fijas de las células del tracto respiratorio (Brown *et al.*, 1974). Además, se descama el epitelio y con el tiempo el agente se multiplica y avanza por el árbol bronquial; desarrollándose la neumonía (Ross, 1992).

Las células inflamatorias y los fluidos, principalmente macrófagos alveolares y linfocitos B, se infiltran en los tejidos pulmonares; la gravedad hace que estos se sedimenten y

llenen el tejido pulmonar de los lóbulos craneoventrales, lo cual oblitera la luz bronquial; por lo que la resistencia respiratoria:espiratoria se ve disminuida desde 1.08 (normal) hasta 0.6 (Camacho y Calle, 2003). Esto lleva al animal a toser persistentemente, disminuyendo su tolerancia al ejercicio (Blood *et al.*, 2000).

En un estudio in vitro, realizado por Zielinsky y Ross (1993) demostraron que algunas cepas de *M. hyopneumoniae* reducían su capacidad de producir neumonía en los cerdos, mientras que otras cepas seguían causando lesiones; esto puede ser debido probablemente a que se pierde la habilidad para adherirse a los cilios o que exista un crecimiento selectivo de poblaciones de micoplasmas no citotóxicos (DeBey y Ross, 1994). El tipo de consolidación pulmonar observado en la neumonía micoplásmica porcina refleja una distribución broncogénica que compromete la limpieza mucociliar (Andrada *et al.*, 2001).

La patogénesis de la neumonía micoplasmal es dependiente no sólo del daño directo causado a los cilios, sino también del daño a las células del sistema inmune del hospedador (Messier *et al.*, 1990).

## 2.7 Diagnóstico

El diagnóstico de *Mycoplasma hyopneumoniae* es complejo, sobretodo debido a las exigencias del microorganismo para el crecimiento en cultivo y el tiempo de desarrollo en estos medios; por ello una combinación con pruebas de laboratorio pueden usarse para detectar el agente en los porcinos. Sin embargo, las pruebas de laboratorio por si sólo, no ofrecen un diagnóstico certero y el diagnóstico definitivo de este agente solo se da por aislamiento del agente de pulmones neumónicos; además, el diagnóstico de Laboratorio no es concluyente en este proceso, debido a la presencia del agente en animales completamente sanos. Por ello, una correlación entre la presencia del agente o la inducción de anticuerpos en suero y la enfermedad clínica, así como, reducción de la performance del cerdo, nos orientan bien sobre el diagnóstico definitivo de este agente (Thacker, 2001).

Para realizar cultivos se requiere un caldo de cultivo especial que contiene suero porcino negativo a los anticuerpos de *M. hyopneumoniae*; este procedimiento es

difícil, sin embargo, si el cultivo se realiza correctamente, sigue siendo el mejor método para detectar la enfermedad (Thacker, 2001).

Los pulmones procedentes de camales no sirven como material de análisis, debido a la contaminación con el agua del escaldado. Los hallazgos anatomopatológicos solamente permiten llegar al diagnóstico de neumonía micoplásmica acompañados de otras pruebas (Plonart y Bickhardt, 2001).

Existen otras técnicas de detección, como inmunofluorescencia e inmunohistoquímica, técnicas también insensibles y difíciles de implementar en un laboratorio por la falta de anticuerpos específicos para realizarlas.

Otros métodos serológicos utilizados para el diagnóstico de *M. hyopneumoniae* son: Hemaglutinación Indirecta (HI), Fijación del Complemento (FC), y ELISA. Distintas técnicas de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) se han desarrollado para el diagnóstico de este agente, teniendo éxito en su detección. Entre todos estos, el más utilizado es la técnica de ELISA, por su capacidad rutinaria de procesar grandes volúmenes de muestras (Wallgren *et al.*, 1996).

Actualmente, la mayoría de los laboratorios trabajan con métodos serológicos (detección de anticuerpos); estos métodos además de permitir muestrear un gran número de animales, permiten conocer con más exactitud que las anteriores la prevalencia y la dinámica del comportamiento de la enfermedad dentro de una explotación, así como el momento de exposición al agente. Permiten también, comprobar la eficacia de los programas de control, programas de vacunación y junto con el diagnóstico anatomopatológico evaluar los programas de erradicación.

*Mycoplasma hyopneumoniae* posee diferentes proteínas en su estructura y aunque las funciones de éstas aún no han sido descritas, sus reacciones específicas pueden ser usadas en el futuro como herramientas de diagnóstico (Caron *et al.*, 2000a). Por ejemplo, la proteína p36 es un antígeno común de las cepas de *M. hyopneumoniae* y no se encuentra en otra especie de micoplasma; debido a su alta especificidad, proteína p36, o los anticuerpos hechos contra esta proteína se pueden utilizar para la identificación de las cepas de *M. hyopneumoniae* (Stipkovits *et al.*, 1991).

## 2.7.1 Detección de antígenos

Entre estas pruebas se encuentran la técnica de Anticuerpos Fluorescentes e inmunohistoquímica.

### 2.7.1.1 Anticuerpos Fluorescentes

Este ensayo se basa en la detección del antígeno del agente en las vías aéreas de los cerdos infectados, pudiéndose utilizar tejido pulmonar congelado (Thacker, 2001). Los mejores resultados se obtienen con muestras de porcinos en fase aguda; la fluorescencia de la muestra observada a través de un microscopio indica la presencia del antígeno. Sin embargo, esta prueba no puede detectar antígeno en infecciones de menor grado de porcinos infectados crónicamente, además pueden perderse los antígenos detectables al momento del transporte al laboratorio y se necesita de un microscopio de fluorescencia (Halbur, 1997).

### 2.7.1.2 Inmunohistoquímica

En esta prueba se utilizan secciones de bloques de tejidos embebidos en parafina y fijados en formalina, éstos pueden ser de casos recientes o de tejidos almacenados. Permite observar la presencia del antígeno en las células blanco en relación con la lesión típica (Halbur, 1998).

El uso de Inmunohistoquímica para el estudio de *Mycoplasma hyopneumoniae* es limitado debido a que aun no están disponibles anticuerpos monoclonales específicos contra este agente; sin embargo se ha detectado el antígeno de *M. hyopneumoniae* en el epitelio de las vías aéreas por inmunohistoquímica usando anticuerpos policlonales (Doster y Lin, 1988). Aunque el uso de esta técnica es limitada ya que este agente comparte determinantes antigénicos con otros dos micoplasma presentes en los porcinos, como el *M. flocculare* y *M. hyorhinis* (Armstrong *et al.*, 1983; Bolske *et al.*, 1987; Thacker, 2001).

## **2.7.2 Detección de anticuerpos**

### **2.7.2.1 Inhibición de la Hemaglutinación (HI)**

La HI tiene alta especificidad y sensibilidad, pero su ejecución no es fácil para todos los laboratorios por lo que no se realiza de forma rutinaria. A partir de lavados pulmonares detecta todas las inmunoglobulinas, aunque de forma más marcada en las Ig A, útil en el diagnóstico de infecciones tempranas. Presenta poca correlación con las técnicas de FC y ELISA (Andrada *et al.*, 2003).

### **2.7.2.2 Inmunofluorescencia (IF)**

La IF se basa en la utilización de un anticuerpo policlonal o monoclonal conjugado con un fluorocromo sobre cortes de tejido pulmonar en congelación, obtenidos en zonas de pulmón sanas y de zonas con la lesión característica de neumonía micoplásmica (Amanfu *et al.*, 1984; Ross, 1992; Maes *et al.*, 1996; Kobisch y Friis 1996). Esta técnica es útil en el diagnóstico de la fase aguda de la enfermedad, cuando existen grandes cantidades de micoplasmas en el pulmón; pero su presencia en la lesión no excluye la presencia de otros agentes ni determina el carácter del proceso en cuanto a ser agudo o crónico; además, en procesos crónicos pese a obtenerse las muestras de lesiones neumónicas claras no se puede demostrar su presencia en la lesión, hecho que se explicaría porque el número de micoplasmas desciende, a medida que el proceso se hace crónico (Andrada *et al.*, 2001).

### **2.7.2.3 Inmunoperoxidasa (IP)**

La técnica de la inmunoperoxidasa indirecta fue aplicada por primera vez para el diagnóstico de *M. hyopneumoniae* sobre cortes de tejido pulmonar fijados en formol e incluidos en parafina. La sensibilidad de inmunoperoxidasa sobre cortes en parafina es muy alta, pero plantea la misma problemática que la IFD en casos crónicos (Andrada *et al.*, 2001).

#### **2.7.2.4 Fijación de Complemento (FC)**

La FC es una técnica con alto grado de sensibilidad y especificidad, para grandes volúmenes de muestras el laboratorio requiere cierto grado de experiencia en la técnica, aunque con esta salvedad puede ser una técnica rutinaria asequible, los anticuerpos frente a *M. hyopneumoniae* se detectan a las dos semanas de la exposición a la bacteria (postinfección), pero no se detectan pasados cinco meses postinfección. Además, presenta otra desventaja detecta Ig M, cuya vida en el suero es muy corta.

#### **2.7.2.5 Inmuno Ensayo ligado a Enzimas (ELISA)**

La técnica de ELISA tiene un alto grado de sensibilidad (95.6%) y especificidad (98.8%) cuando se analiza suero porcino (Blood *et al.*, 1999), esta técnica detecta anticuerpos desde las 2 ó 3 semanas del contacto con el agente hasta un año postinfección (Bereiter *et al.*, 1990), alcanzando la respuesta más alta a las 10–12 semanas postinfección y a partir de aquí decaen los anticuerpos; el momento de aparición y la tasa de anticuerpos está en función de la edad a la que se infectan los lechones (Sheldrake y Romalis, 1992).

Detecta Ig G, que son los anticuerpos que permanecen más tiempo en suero, lo que la hace más ventajosa que con FC. Nicolet *et al.* (1980) y Bommeli y Nicolet (1983) desarrollaron un ELISA indirecto que usa un extracto con Tween 20 para la detección de anticuerpos contra *M. hyopneumoniae*, minimizándose las reacciones cruzadas con otros agentes (Bereiter *et al.*, 1990). Otras técnicas desarrolladas son el ELISA de bloqueo (Feld *et al.*, 1992); siendo éste el que más minimiza los problemas de reacciones cruzadas con otros micoplasmas, basado en la utilización de un anticuerpo monoclonal contra la proteína de 74 KDa de *M. hyopneumoniae* (Andrada *et al.*, 2003).

El ELISA de bloqueo detecta infecciones con cepas de campo de *M. hyopneumoniae* y no detecta anticuerpos contra otros micoplasmas patógenos cercanos (Halbur, 1997); sin embargo, algunas vacunas manifiestan poca respuesta serológica al epítipo de esta prueba, por lo que puede ser negativa en animales vacunados, mientras que el resultado puede ser positiva con ELISA indirecto (Stevenson, 1999).

En una comparación de pruebas de ELISA, se encontró que ELISA indirecto detecta más tempranamente anticuerpos que el de bloqueo; sin embargo, esta última tiene menos reacciones cruzadas (Wallgren *et al.*, 1996).

La evaluación del calostro puede ser una estrategia útil para monitorear la infección con el objeto de erradicar el agente de las granjas porcinas (Zimmermann *et al.*, 1989; Zimmermann, 1990).

Comparado con otros métodos tales como Hemaglutinación indirecta (HI) y Fijación de complemento (FC); el método de ELISA es generalmente más sensible (Armstrong *et al.*, 1983) y los anticuerpos pueden ser demostrados por un largo periodo de tiempo (Bereiter *et al.*, 1990).

El test de ELISA indirecto ha sido usado por diversos investigadores como Sheldrake y Romalis (1992), Thacker (2001), Jayappa *et al.* (2001), y León *et al.* (2001) todos ellos midieron anticuerpos contra micoplasma en suero porcino. En el Perú, Huallanca, *et al.* (2001), utilizaron la prueba de ELISA indirecta para determinar cerdos seroreactores a *M. hyopneumoniae* procedentes de granjas tecnificadas del valle de Lima.

### **2.7.3 Detección de ADN**

#### **2.7.3.1 Hibridización in situ**

La técnica de hibridización **in situ** puede ser usada para detectar ADN de *Mycoplasma hyopneumoniae* en tejidos y también es una técnica de gran valor para estudiar la patogénesis de la infección por micoplasma (Kwon *et al.*, 2002).

#### **2.7.3.2 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)**

Una alternativa de diagnóstico es el PCR, el cual posee una alta sensibilidad y especificidad además, de ser una técnica rápida (Bej *et al.*, 1991). Con PCR se puede tener el diagnóstico en un período de solo 2 días, esta prueba se usó desde inicios de los años 90 (Harasawa *et al.*, 1991), pero no fue evaluado bajo condiciones de campo.

También se han desarrollado técnicas de PCR para evidenciar la presencia de *M. hyopneumoniae* en tejido pulmonar, en hisopos con exudado nasal y en líquido

procedente de lavados tráqueobronquiales, con resultados muy positivos. Estas técnicas están basadas en el análisis de la secuencia de ADN mediante la utilización de primers (iniciadores).

La mejor muestra para la detección de *M. hyopneumoniae* por PCR son las muestras de lavados bronquiales (Thacker, 2001). Verdin *et al.* (1996) desarrollaron una técnica de PCR anidado que detecta *M. hyopneumoniae* en lavado tráqueobronquiales, siendo este método más sensible que las pruebas serológicas e inmunofluorescencia, sobre todo en estadios tempranos de la infección. Recientemente, se ha descrito una técnica de PCR anidada capaz de detectar *M. hyopneumoniae* a partir de hisopos nasales. Se comprobó que los resultados de la PCR anidada estaban relacionados con sintomatología clínica y posterior seroconversión, proporcionando información muy precisa sobre la dinámica de infección (Calsamiglia *et al.*, 1999).

En los últimos años se han probado diferentes técnicas de PCR para detectar *M. hyopneumoniae*, es así que se desarrollaron éstas basadas en detectar la p36 y otra donde se detectaba la p46 y una técnica múltiple donde analizaban la p36 y p46 de manera conjunta. La técnica de PCR-p36 parece ser más sensible ya que detecta el 93.3% de casos positivos en lavados tráqueobronquiales y 100% de positivos en tejidos pulmonares. Mientras que las PCR-p46 y la PCR-p36-p46 tuvieron una sensibilidad de 86.6%. En conclusión, ambos, el ensayo simple y el PCR múltiple, son herramientas muy eficaces para detectar la presencia de *M. hyopneumoniae* en especímenes clínicos diferentes, incluso en muestras de animales vivos, pudiendo descubrirse la infección en una fase temprana, y tomarse las medidas convenientes para limitar el daño causado en las granjas (Caron *et al.*, 2000a).

## 2.8 Diagnóstico diferencial

Es importante establecer un diagnóstico diferencial, fundamentalmente porque *M. hyopneumoniae* interacciona con los otros patógenos respiratorios del cerdo y es necesario conocer qué organismos están implicados en las lesiones neumónicas que se observan; además la mera presencia de *M. hyopneumoniae* en pulmón o vías respiratorias no implica necesariamente que se desarrolle la enfermedad; entre los

patógenos más comunes se encuentran el virus de la Influenza porcina, el virus del PRRS, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuroneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Bordetella bronchiseptica* y *Streptococcus*.

## **2.9 Control y Erradicación**

Cuando se evidencia en una granja la problemática asociada a la presencia de *Mycoplasma hyopneumoniae*, la mayoría puede optar por tomar dos decisiones: actuar de modo pasivo, sin emprender acciones que solucionen el problema, o bien actuar de modo activo, procurando adoptar medidas correctivas que nos ayuden a solventar los problemas que se suceden (Andrada, *et al.*, 2003).

La gravedad de la enfermedad viene determinada por diversos factores, como los sistemas de manejo, las condiciones ambientales, el estado inmunológico de los animales y una compleja interacción con otros patógenos. En la mayoría de las explotaciones porcinas convencionales no se intenta erradicar, sino evitar que se desarrollen lesiones pulmonares graves que afecten al rendimiento de los animales.

### **2.9.1 Control**

El control de la neumonía enzoótica tiene básicamente dos objetivos, el reducir la presión de infección y, reducir la incidencia de la enfermedad. Hoy en día, es posible conseguir el control total de la neumonía enzoótica con unas prácticas adecuadas que incluyen la combinación de tres medidas clave: manejo, medicación y vacunación. Cada granja presenta patrones de infección y seroconversión distintos. Este punto sugiere que cada granja es un caso particular necesario de estudio a la hora de determinar un programa de medicación/ vacunación/cambio de manejo. Al tratarse de una enfermedad dinámica, las estrategias que se implementen deben controlarse y modificarse en función de su evolución (Andrada, *et al.*, 2003). Entre las medidas mas resaltantes tenemos:

#### **2.9.1.1 Manejo**

Existen muchos factores de riesgo que tienen un impacto importante sobre las enfermedades respiratorias. De hecho, las buenas prácticas de manejo y las instalaciones en que se hallan los animales son vitales para una correcta prevención de la enfermedad. También están involucrados en el riesgo de adquirir

enfermedades respiratorias la distancia a granjas posiblemente infectadas, el tamaño de las granjas vecinas y la densidad porcina en la región en la que se localiza la explotación.

Podemos lograr resultados satisfactorios, es decir, una reducción en el riesgo de enfermedades, una mejora en el rendimiento productivo y una disminución de los gastos de medicaciones y mano de obra si actuamos en la mejora de los siguientes factores:

- Tamaño de la granja
- Política de compra de animales
- Sistema de producción
- Estilo de construcción de las naves
- Método de alimentación
- Acceso al agua
- Ventilación
- Características del suelo
- Luz
- Higiene
- Calefacción
- Tipo de manejo
- Movimiento de animales
- Temperatura
- Humedad
- Gases
- Bioaerosoles
- Polvo
- Otros

#### 2.9.1.1.1) Sistemas de producción

Incluso en sistemas de producción que usan estrategias para mejorar el estado sanitario de los cerdos, los problemas debidos a la neumonía enzoótica pueden ser graves. Esto podría explicarse parcialmente por la baja tasa de contacto de los cerdos jóvenes con *Mycoplasma hyopneumoniae* antes de ser llevados a las unidades de finalización.

El uso de prácticas "todo dentro-todo fuera" permite una rigurosa limpieza y desinfección de las instalaciones y limita la difusión de microorganismos vía aerógena. La introducción de estrategias de producción a tres bandas, también llamada producción multifase, presenta varias ventajas sobre los métodos tradicionales: eliminación de agentes infecciosos sin la necesidad de una despoblación total; productividad incrementada desde el destete hasta el engorde; estadísticas reproductivas mejoradas cuando se mezclan lechones de diferentes orígenes, con una mejora consecuente en la producción, costos veterinarios reducidos y, en general, una mayor eficiencia.

Es posible producir cerdos negativos a *Mycoplasma hyopneumoniae* a partir de granjas positivas, particularmente cuando los lechones pueden destetarse pronto y fuera de las instalaciones. La erradicación ha sido descrita en varios países, incluyendo Suiza, Suecia y Finlandia. Métodos distintos como la cesárea y cría fuera de las instalaciones, segregación temprana, y destete y despoblación de animales más jóvenes han resultado en la completa eliminación de *Mycoplasma hyopneumoniae* y la mejora de los parámetros productivos.

#### 2.9.1.1.2) Control de la temperatura

Deberían evitarse cambios bruscos de temperatura, así como reducirse al mínimo las diferencias térmicas en los cerdos de crecimiento y finalizadores.

#### 2.9.1.1.3) Ventilación y control del polvo

Una de las bases de un buen ambiente es proporcionar un aire de calidad y una ventilación correcta de las naves. Los gases dañinos (NH<sub>3</sub>, SH<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>), presentes donde los animales están confinados, actúan como irritantes y causan estrés. La calidad del aire debería controlarse en cuanto a circulación y volumen por tamaño de la población. Para reducir el polvo, se recomienda añadir a la dieta un 2-4% de grasa.

#### 2.9.1.1.4) Densidad y tamaño de la explotación

La densidad de población es uno de los factores claves para la diseminación de *Mycoplasma hyopneumoniae* entre animales. Un estudio realizado entre mayo de 1996 y mayo de 2001 por el Comité Danés de Producción Porcina (931 explotaciones libres de *Mycoplasma hyopneumoniae*) comprobó que

varios factores contribuían a aumentar el riesgo de infección. Cuando se doblaba la densidad de cerdos, considerando como tal el número de cerdos en relación con la distancia a explotaciones vecinas, el riesgo de infección se incrementaba en un 50%. El tamaño de la explotación también influía, puesto que cuando se doblaba el número de cerdos en la explotación, el riesgo de infección se incrementaba en un 12-13%. Concretamente, se comprobó que en explotaciones que engordaban más de 800 cerdos al año, el riesgo era 2,5 veces superior que para las explotaciones por debajo de este tamaño.

#### 2.9.1.1.5) Transporte de los cerdos a las unidades de finalización

Debería realizarse bajo las mejores condiciones, siguiendo recomendaciones locales o internacionales y normativas.

### 2.9.1.2 Medicación

El tratamiento antibiótico frente a *Mycoplasma hyopneumoniae* ha sido ampliamente utilizado durante años. A pesar de que no elimina el agente infeccioso ni impide el desarrollo de lesiones pulmonares típicas, es capaz de reducir los síntomas clínicos asociados al agente y la mortalidad que se produce en caso de infecciones múltiples. Es importante realizar un buen diagnóstico en estos casos, ya que pueden participar diferentes patógenos respiratorios.

*Mycoplasma hyopneumoniae* es sensible a diversos antimicrobianos *in vitro*. Los antibióticos mayormente utilizados y con mayor eficacia son la doxiciclina, tetraciclina, tiamulina, tilosina, espiramicina, valnemulina y lincomicina, entre otros. Las fluoroquinolonas también son eficaces, pero su uso en cerdos debería limitarse debido a la actual preocupación relacionada con la resistencia antimicrobiana.

Se ha demostrado la eficacia de la doxiciclina en el tratamiento de la neumonía enzoótica. Los cerdos afectados, tratados con doxiciclina vía oral, han mostrado mayor ganancia de peso, menos lesiones pulmonares, menor temperatura rectal, reducción de morbilidad y mortalidad y un porcentaje más elevado de recuperación de los animales comparado con los no tratados. En adición, Lincomicina, Tetraciclina y Tilosina son hábiles en inhibir el crecimiento del agente *in vitro* (Friis y Szancer, 1994).

Los antibióticos como amoxicilina, ampicilina, penicilina, cefalosporina, polimixina, estreptomina, eritromicina, trimetoprim y sulfamidas no son útiles en el tratamiento y control de esta enfermedad. La resistencia de los micoplasmas a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (que interfieren con la formación de la pared de la célula bacteriana) se explica por la ausencia de pared celular.

También se aplican medidas profilácticas para evitar el inicio de la enfermedad. Así, diversos autores han reportado la eficacia de programas de dosificación pulsátil para prevenir las pérdidas asociadas a infecciones por *Mycoplasma hyopneumoniae* en unidades de crecimiento-finalización. El uso de quinolonas, tiamulina, lincomicina, josamicina, tetraciclinas y combinaciones de ellas, han mostrado resultados positivos. Estos antibióticos deberían ser usados durante periodos de máximo estrés (destete, transferencia a instalaciones de finalización, transporte, movimientos, vacunación, etc.). No obstante, cabe recordar que la profilaxis con antibióticos no es un sustituto de la buena higiene y el buen manejo. Estas prácticas deberían realizarse conjuntamente.

Usando medicación, la mejor respuesta en reducir la neumonía se da cuando los individuos con tos son tratados tempranamente en el alimento (Kavanagh, 1992). Aunque en general, se puede aseverar que el tratamiento antibiótico no previene el establecimiento de la infección, solo previene la enfermedad clínica y el cese de la medicación lleva a nuevas infecciones.

### **2.9.1.3 Vacunación**

La vacunación sobre todo reduce o incluso evita, en algunos casos, las lesiones pulmonares causadas por *Mycoplasma hyopneumoniae*. Como consecuencia, disminuye el índice de conversión en los animales vacunados en comparación con animales no vacunados, aportando, la mayoría de las veces, un beneficio económico. El criterio a seguir para recomendar la vacunación en una granja depende de varios factores: el momento de la infección, la presión de dicha infección, el tipo de granja, etc.

La mejor manera de evaluar si la vacunación es rentable es comparar en el matadero el porcentaje de lesiones en los pulmones obtenidos de los cerdos de cebo antes del establecimiento del plan vacunal, con los pulmones obtenidos de los animales vacunados, tomando evidentemente un número de muestras significativo. Más práctico y sencillo, pero algo menos fiable, es la comparación a

nivel clínico de los problemas respiratorios que se producen en los cerdos en fase de cebo, en un mismo periodo de tiempo, en animales vacunados y no vacunados de la misma granja. La vacunación de la hembra, reduce la prevalencia de lechones colonizados por micoplasma al destete; lo cual puede ser usado como método de control de la enfermedad en sistemas estrictos de “todo dentro todo fuera”, produciendo una mayor seroconversión de las cerdas y una eficiente transferencia de anticuerpos calostrales a sus lechones, la cual puede detectarse a las 7 semanas de edad (Pijoan, 2002).

La vacunación puede reducir la neumonía y las pérdidas asociadas a *Mycoplasma hyopneumoniae*. En granjas afectadas gravemente, se ha logrado un ratio beneficio : costo de hasta 5:1. El momento en que los cerdos se infectan puede determinarse mediante serología y PCR, buscando seroconversión activa y presencia del patógeno en cuestión, en el tracto respiratorio superior. La vacunación debe planificarse atendiendo a estos puntos.

Las vacunas inactivadas frente a *Mycoplasma hyopneumoniae* han demostrado ser eficaces en el control de neumonía enzoótica y la reducción de las lesiones pulmonares causadas por dicha infección. No obstante, se ha demostrado que la eficacia de algunas vacunas frente a *Mycoplasma hyopneumoniae* varía enormemente, dependiendo principalmente del adyuvante empleado. Por otro lado, se ha observado que vacunas oleosas, que contienen aceite como adyuvante en mayor o menor porcentaje, han causado reacciones en el punto de inoculación.

El desarrollo de vacunas formuladas con nuevos adyuvantes han permitido superar estos problemas, asegurándose la inocuidad en los animales y la protección a nivel de campo. A pesar de que existen diferencias en la capacidad inmunógena de las distintas cepas de *Mycoplasma hyopneumoniae*, las cepas utilizadas para desarrollar vacunas inactivadas frente a este microorganismo son, en general, poco inmunogénicas. Esto significa que es necesario formular las vacunas con adyuvantes potentes que proporcionen a la vacuna la capacidad de estimular una elevada respuesta humoral y celular.

La formulación de una vacuna frente a *Mycoplasma hyopneumoniae* que contenga la combinación de levamisol y carbómero como adyuvantes proporciona un efecto doble, ya que ofrece una inmunidad más alta y duradera debido a la sinergia de las propiedades de ambos componentes: por un lado, el levamisol es

un fuerte potenciador de la inmunidad que estimula las respuestas humoral y celular, mientras que, por otro lado, el carbómero permite la liberación lenta del antígeno vacunal tras la inoculación. En este tipo de vacuna, la combinación antígeno-adyuvante estimula la producción de anticuerpos contra la infección producida por *Mycoplasma hyopneumoniae* y la respuesta mediada por células está muy incrementada debido principalmente a las propiedades de este particular adyuvante (Espuña, *et al.*, 1994). Así el “Amphigen” (compuesto de derivado fosfolípido de lecitina y un glicolípido surfactante) posee las características de un aceite muy refinado, dándole escasa viscosidad, por lo cual ofrece ventajas respecto a adyuvantes convencionales, como por ejemplo reduciendo al mínimo las reacciones adversas locales (como masas, abscesos y granulomas en el sitio de inyección). La llave del entendimiento de los efectos inmunes que realzan y aseguran al “Amphigen”, es la lecitina, en donde los investigadores han descubierto que contiene configuraciones estereoquímicas (colocación espacial de átomos dentro de una molécula) que imitan a aquellas células del cuerpo del animal. El hidróxido de aluminio, adyuvante comúnmente usado en la mayoría de vacunas y adyuvantes en base a aceites comerciales, carecen de esta propiedad estereoquímica.

Este tipo de vacuna aumenta la respuesta inmune celular, como resultado de la interacción entre el antígeno vacunal y el adyuvante. Este estímulo implica la activación de los macrófagos y los linfocitos B. Los macrófagos alveolares son importantes en la defensa contra la neumonía enzoótica, ya que digieren y presentan los antígenos de *Mycoplasma hyopneumoniae* (estructuras proteicas de la superficie celular) a los linfocitos T, que se convierten en células T cooperadoras activadas y liberan citoquinas para aumentar la capacidad de las células B para producir más anticuerpos. Se ha ensayado el uso de vacunas vivas lapinizadas, aplicadas en aerosol, orales intraperitoneales y adyuvantadas en diluyente oleoso (Andrada *et al.*, 2003). Además, el desarrollo de vacunas ADN parece ser promisorio como método de control de *M. hyopneumoniae*, ya que ésta estimula ambas respuestas humoral y celular, sugiriéndose que ésta sea hecha a base de la proteína P42 (Chen *et al.*, 2003). El antígeno recombinante Mhp 1 (una proteína de *M. hyopneumoniae*), se ha diseñado como vacuna potencial, pero sólo proporciona una mínima protección (King *et al.*, 1996).

### **2.9.1.3.1. Vacunación a una dosis**

Actualmente, se han desarrollado vacunas de una dosis que intentan emular el efecto booster de las vacunas de dos dosis, mediante el uso de un adyuvante fuerte. Yeske (2001) en EE.UU. recomienda reservar las vacunas de una dosis para granjas donde se practique el sistema “todo dentro todo fuera”, que tengan baja presentación de casos de PRRS y además que ésta se aplique al final del periodo de destete cuando los cerdos tienen entre 9 a 10 semanas de vida para obtener un impacto mínimo sobre los anticuerpos maternos y maximizar la respuesta a la vacuna.

Existen vacunas de una dosis que inducen una respuesta inmune efectiva que dura hasta 25 semanas posvacunación, reduciendo el manejo y el estrés sobre el animal que implican los productos de dos dosis (Kuhn, 2000b). Por otro lado, se ha comprobado que la inmunización a las 8 semanas de edad alcanza una inmunidad óptima a las 12 semanas (Kuhn, 2000a).

Existen bacterinas comerciales de dosis única y con mayor concentración antigénica, que ofrece una respuesta serológica efectiva contra el micoplasma, al estimular los Th1 de la respuesta celular inmune, además, conduce a una respuesta inmune humoral/local en las mucosas, elevando los niveles de IgG e IgA en los fluidos bronquioalveolares (Casique, 2002; Kuhn, 2000b).

Estas bacterinas monodosis están hechas a base de un cultivo a célula completa inactivada de *M. hyopneumoniae* desactivadas químicamente, lo que hace que sea incapaz de causar la enfermedad respiratoria, pero, efectiva en estimular la respuesta inmunológica. Además, contiene un adyuvante de aceite en agua, hecho a base de micelios, cubiertos por lecitina, permitiendo que más antígenos se adhieran, que con los tradicionales adyuvantes a base de aceite; este adyuvante realza y prolonga aún más la respuesta inmunológica, ayudando a la vacuna a activar las células macrófagos del sistema inmunológico y estimular una respuesta inmunológica más completa y prolongada (Kuhn, 2000b).

### **2.9.1.3.2 Vacunación a dos dosis**

La vacunación con dos dosis reduce la prevalencia de colonización por micoplasmas más eficientemente aunque no existen diferencias significativas con las vacunas de dosis única (Pijoan, 2002).

No existen diferencias estadísticas significativas en la habilidad de reducir lesiones pulmonares inducidas por desafíos experimentales entre vacunas comerciales de dos dosis. Una de las principales diferencias entre vacunas comerciales contra micoplasma es el porcentaje de cerdos vacunados que experimentan la seroconversión luego de la vacunación. La variabilidad en la seroconversión, puede deberse a las diferencias en los adyuvantes o proteínas inmunogénicas presentes en las vacunas (Thacker, 1999b).

## **2.9.2 Erradicación**

La implicación de *Mycoplasma hyopneumoniae* en el Complejo Respiratorio Porcino lleva a un mayor esfuerzo en la eliminación de la infección de las instalaciones porcinas. Existen distintos procedimientos que se han llevado a cabo para conseguir eliminar el micoplasma de las explotaciones:

- 1) Obtención de lechones por histerectomía y aislamiento de los mismos.
- 2) Destete precoz medicado, en el que las cerdas se trasladan antes de parir y se someten a un tratamiento antibiótico, al igual que a sus propios lechones.
- 3) Despoblación total de las unidades, con una posterior repoblación con animales procedentes de explotaciones negativas, libres de *Mycoplasma hyopneumoniae* (normalmente, núcleos genéticos o multiplicadoras).

Este último sistema es muy caro, por lo que existen nuevas estrategias de erradicación, como la despoblación de los animales más jóvenes. Este programa de erradicación, conocido también como método suizo, utiliza despoblación parcial y consiste en el vaciado de la granja de animales menores de 10 meses de edad durante dos semanas. Durante este periodo, los animales son medicados y los lechones nacidos después de este periodo no serán infectados, porque no quedan animales portadores de la enfermedad en la granja.

Este método se ha empleado en Europa durante los últimos años, con resultados satisfactorios en Finlandia, Noruega y Dinamarca, especialmente en explotaciones pequeñas. El intervalo de tasa de éxito es del 80% al 100%. Se desconoce si estos sistemas de erradicación son adecuados para eliminar *Mycoplasma hyopneumoniae* de granjas grandes o de granjas localizadas en áreas muy pobladas. De hecho, no hay casos publicados de la aplicación de dichos protocolos en granjas de mayor tamaño, donde se sospecha de la existencia de subpoblaciones de madres positivas y negativas al microorganismo, independientemente de la edad.

Todavía no existen programas nacionales de erradicación de *Mycoplasma hyopneumoniae* en Europa. No obstante, algunos datos obtenidos en algunos países como un programa regional de erradicación aplicado con éxito en Finlandia y un estudio preliminar realizado en Dinamarca, muestran que un programa nacional de erradicación para *Mycoplasma hyopneumoniae* sería beneficioso (Zimmermann, 1990).

### III. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 Lugar de estudio:

El estudio se desarrolló en las instalaciones de una granja porcina tecnificada, localizada en el valle del río Chillón, distrito de Puente Piedra, en la provincia y departamento de Lima.

#### 3.2 Manejo de los animales en la granja

La granja trabaja con el sistema de producción “todo dentro, todo fuera” en un solo sitio, cuenta con un plantel reproductor de 600 madres; después de la parición los lechones permanecen con sus madres  $19 \pm 2$  días, asegurando de esta manera la toma de calostro; posteriormente los lechones son trasladados al área de recría hasta los 70 días de edad, luego pasan al área de engorde donde permanecerán hasta alcanzar el peso de beneficio (90 Kg. de peso vivo) que en promedio se alcanza a los 145 días de edad. La granja tiene historial de ser positiva a *Mycoplasma hyopneumoniae*, pero no realizan vacunaciones contra esta enfermedad ni administran antibióticos micoplasmicidas en el alimento.

#### 3.3 Animales y tamaño de la muestra.

El número de animales que participaron en el ensayo se determinó utilizando la formula de Diferencia de Medias (Snedecor y Cochran, 1986) y se detalla en la siguiente ecuación:

$$n = 2 \left[ \frac{[Z(a) + Z(b)] \times SD}{m1 - m2} \right]^2$$

Donde:

Z (a) = valor tabular de Z al 95 % de confianza (1.96)

Z (b) = valor para el 90 % de la potencia de la prueba (1.65)

SD = Desviación Estándar esperada, que es de 2 Kg. \*

m1 = media de la población 1 = 84 Kg. \*

m2 = media de la población 2 = 81 Kg.

\* (Valdivia y Calle, 1999)

Por lo tanto, el tamaño mínimo para cada uno de los tratamientos es de 12 animales. En esta prueba se utilizó 30 animales por cada tratamiento, 50% machos y 50% hembras.

Los lechones seleccionados fueron tatuados en la oreja al destete (promedio de edad de 21 días) aparentemente, en buen estado de salud y recibieron un manejo y programa sanitario que normalmente se emplea en la granja.

### 3.4 Diseños Experimentales

Los animales siguieron un programa de doble vacunación contra *Mycoplasma hyopneumoniae* y fueron agrupados en las siguientes unidades experimentales:

Tratamiento	Número de animales	Programa de Vacunación
1	30	35 y 56 días de edad
2	30	42 y 56 días de edad
3	30	Control (no vacunado)

### 3.5 Materiales usados durante el muestreo:

- Tubos Vacutainer®
- Agujas para Vacutainer (21 x 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub>)
- Algodón.
- Tintura de yodo.
- Balanza.
- Fichas diarias de registro.
- Tinta china.
- Bacterina contra *Mycoplasma hyopneumoniae* (Respisure®).

### **3.6 Materiales y equipos usados en el laboratorio:**

- Centrífuga
- Congeladora
- Viales
- Tips
- Gradillas
- Pipetas multicanales y monocanales
- Kit de ELISA para detección de anticuerpos contra *Mycoplasma hyopneumoniae* (HerdChek\* M hyo)
- Agua destilada
- Erlenmeyer
- Espectrofotómetro

### **3.7 Método de colección de muestras**

Se colectaron muestras de sangre de todos los animales por punción de la vena cava anterior utilizando tubos al vacío (Vacutainer®) sin anticoagulante. La toma de muestra se realizó de dos maneras según la edad del animal; hasta los 2 meses, el animal fue derribado y sujetado en posición decúbito dorsal con el cuello estirado; y aquellos de mayor edad, la toma fue con el animal en pie sujetándolo con un lazo corredizo por la boca.

Se tomaron entre 5 y 7 ml de sangre, seguida de la identificación de la muestra extraída. Posteriormente, las muestras fueron enviadas al laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM, donde se procedió a su centrifugado para la obtención de los sueros, los cuales fueron almacenados en viales a temperatura de congelación hasta el momento en que se realizó el test serológico. Este procedimiento se realizó en 6 oportunidades: a las 3, 6, 10, 12, 16 y 21 semanas de edad.

## **3.8 Recolección de datos:**

### **3.8.1. Ganancia de peso**

El peso de cada grupo se evaluó en dos oportunidades, a los 21 días (destete) y al beneficio 145 días (saca). Con la información obtenida se procedió a determinar la ganancia de peso de los animales en forma individual. Los datos fueron llenados en los registros con su respectivo número de identificación. Con el consumo de alimento promedio entre el destete y el beneficio se calculó el índice de conversión alimenticia.

### **3.8.2. Método de Detección de Anticuerpos: Prueba comercial de ELISA (HerdChek\*<sup>M</sup> hyo)**

#### 3.8.2.1.- Preparación de las muestras

Las muestras fueron diluidas en el diluyente en razón de 1:40 antes de empezar el análisis.

#### 3.8.2.2.- Preparación de la solución de lavado

Se dejó que la solución de lavado 10X alcanzara una temperatura de 20-27 °C y se mezcló para la disolución de sales precipitadas. La solución de lavado se diluyó en proporción de 1:10 con agua destilada antes de ser empleada.

#### 3.8.2.3.- Procedimiento del análisis

Se dejó temperar los reactivos y agitó suavemente con movimientos circulares.

- Se cogió las placas tapizadas con antígenos y se anotó las posiciones de las muestras en el cuaderno de trabajo.
- Se añadió 100 µl de control negativo en los posillos A1 y B1.
- Se añadió 100 µl de control positivo en los posillos C1 y D1.
- Se añadió 100 µl de muestra diluida en los posillos correspondientes.
- Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se aspiró el contenido del líquido de todos los posillos y arrojó en un recipiente

de desperdicios.

- Se lavó cada posillo de tres a cinco veces con unos 350 µl de solución de lavado y aspiró completamente.
- Se añadió 100 µl de conjugado anti- porcino: peroxidasa de rábano a cada posillo.
- Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se aspiró el contenido del líquido de todos los posillos y arrojó en un recipiente de desperdicios.
- Se lavó cada posillo de tres a cinco veces con unos 350 µl de solución de lavado y aspiró completamente.
- Se añadió 100 µl de la solución de sustrato TMB en cada posillo.
- Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Se añadió 100 µl de la solución de Interrupción en cada posillo.
- Se calibró el lector en blanco con aire, y
- Finalmente, se midió y anotó los valores de absorbancia a 650 nm.

#### 3.8.2.4.- Lectura e interpretación de los resultados

Para que el ensayo sea válido, la diferencia entre el promedio del control positivo y del control negativo debe ser mayor o igual de 0.150. La absorbancia del promedio del control negativo debe ser menor o igual de 0.150. La presencia o ausencia de anticuerpos frente a *M. hyopneumoniae* se determina por medio de una relación entre el valor de absorbancia de la muestra con el promedio del control positivo. El control positivo está normalizado y representa concentraciones significativas de anticuerpos frente a *M. hyopneumoniae* en el suero y plasma porcino. La concentración relativa de anticuerpos en la muestra se determina a través del cálculo del coeficiente de la absorbancia de la muestra con respecto a la del control positivo (M/P). Los títulos finales se calculan a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Log}_{10} \text{ del título} = 1.09 (\log_{10} \text{ M/P}) + 3.36$$

Para determinar la positividad o negatividad de las muestras se consideraron los siguientes criterios: las muestras con coeficientes M/P menores o iguales de 0,3 se consideraron NEGATIVAS y cuando la relación M/P fue mayor o igual de 0,4 se consideraron POSITIVAS.

### 3.8.3. Evaluación del grado de lesión pulmonar

Se llevó a cabo la evaluación de los 7 lóbulos pulmonares de cada animal al momento del beneficio, a cada lóbulo se le colocó una puntuación según la extensión de la lesión que presentaba (Cuadro 1). Los datos fueron llenados en hojas de registro según el lóbulo pulmonar identificado: Apical derecho (AD), Apical izquierdo (AI), Cardíaco derecho (CD), Cardíaco izquierdo (CI), Diafragmático derecho (DD), Diafragmático izquierdo (DI), Intermedio (I)

**Cuadro 1. Puntuación según la extensión de la lesión de consolidación pulmonar en cada lóbulo**

Puntuación	Extensión de la lesión de consolidación pulmonar en cada lóbulo (% del área pulmonar)
0	Sin consolidación pulmonar.
1	1 al 25%
2	26 al 50%
3	51 al 75%
4	76 al 100%

Fuente: Piffer y Brito (1991)

Posteriormente, con la puntuación dada a cada lóbulo, se calculó el área de consolidación de los lóbulos pulmonares (Cuadro 2). En esta evaluación se tiene en cuenta que cada lóbulo participa sobre el total del pulmón con un porcentaje diferente por la diferencia de pesos.

**Cuadro 2. Área de consolidación de los lóbulos pulmonares según puntuación dada.**

Puntuación	Área de consolidación (%) / lóbulo pulmonar						
	AD	CD	DD	AI	CI	DI	I
0	0	0	0	0	0	0	0
1	1,4	1,4	4,3	0,7	0,7	3,4	0,6
2	4,1	4,1	12,7	2,3	2,3	10,1	1,9
3	6,9	6,9	21,4	3,8	3,8	17,0	3,1
4	9,7	9,7	29,9	5,3	5,3	23,8	4,4

Fuente: Piffer y Brito (1991)

A continuación, a cada lóbulo se le ha dado un área de consolidación, se realiza la sumatoria para determinar el volumen de consolidación pulmonar, los datos obtenidos permiten distribuir a los animales examinados en las diferentes categorías de porcentajes de volumen pulmonar afectado. (Cuadro 3). El índice de neumonía (IDN) es calculado de la siguiente forma:

$$\text{IDN} = \frac{\text{Indice de total}}{N}$$

N= número de animales examinados

**Cuadro 3. Categoría según el volumen de consolidación pulmonar**

Categorías	Porcentaje de Volumen de consolidación
0	0
1	0,1 a 11
2	11,1 a 21
3	21,1 a 31
4	31,1 a 41
5	41,1 a 51
6	51,1 a 100

Fuente: Piffer y Brito (1991)

La interpretación de los resultados obtenidos serán analizados según Dalla Costa et al (2000), según el cuadro 4.

**Cuadro 4. Interpretación de los valores obtenidos en el cálculo del índice de neumonía (IDN)**

IDN	INTERPRETACION
Hasta 0.55	Rebaños libres de neumonía
De 0.56 a 0.8	Rebaños donde la neumonía está presente, pero no constituye una amenaza. Queda evidenciado que existen factores de riesgo y, en caso de no ser corregidos la neumonía puede evolucionar y el índice alcanzar valores mayores.
Más de 0.90	Representa una situación indeseable, con ocurrencia grave de neumonía.

Fuente: Dalla Costa et al (2000)

### **3.9 Análisis Estadístico**

La evaluación de Ganancia de Peso se realizó mediante la prueba de Análisis de Varianza por arreglo factorial para observar el comportamiento de las variables por grupo, sexo y la interacción de grupo y sexo. Los títulos de anticuerpos fueron analizados mediante el Análisis de Varianza por diseño completamente aleatorio, no considerando la variable sexo.

## IV. RESULTADOS

El estudio no encontró diferencia estadística significativa en relación a la ganancia de peso por efecto de los grupos experimentales (Tabla 1) ni en relación al sexo (Tabla 2). Sin embargo, se encontró una tendencia a que los animales del tratamiento 1 tuvieran una mejor ganancia diaria de peso y mejor índice de conversión alimenticia con respecto a los animales del tratamiento 2 y con el grupo control (Tabla 3).

Los títulos de anticuerpos obtenidos por la prueba de ELISA, se observan en la Tabla 4. De ahí podemos notar que el título de anticuerpos al inicio del estudio (21 y 35 días) fue significativamente menor ( $p < 0.05$ ) para el tratamiento 2, en comparación al grupo control y al tratamiento 1. El grupo control muestra una caída del título entre los 35 y 70 días para luego aumentar progresivamente hasta los 145 días.

A partir de los 70 días, luego de las vacunaciones respectivas de ambos grupos, el título de anticuerpos aumentó resultando ser significativamente mayor con respecto al grupo control. Estas diferencias se mantuvieron hasta los 145 días. No se observó diferencia significativa en los títulos de anticuerpos entre los tratamientos propuestos.

A pesar de que ambos grupos vacunados presentaron un mejor nivel de títulos de anticuerpos, no se observó que estos tengan una significativa ganancia de peso como respuesta a estas vacunaciones. Lo variado que resultan estos hallazgos en los tratamientos propuestos, se podría deber a las diferentes condiciones en las que se ha realizado el estudio en comparación con otros estudios (zona geográfica, esquemas de vacunación, manejo, potencial genético de los animales, respuesta individual, etc.)

**TABLA Nº 1 Ganancia de peso total durante el periodo de recría a beneficio (Kg.)**

GRUPOS	Número de animales	Media	Desviación estándar	Intervalo de Confianza 95%	
				Valor mínimo	Valor máximo
Tratamiento 1	30	86,714 <sup>a</sup>	8,304	83,483	89,944
Tratamiento 2	30	83,303 <sup>a</sup>	10,348	80,073	86,534
Control	30	82,860 <sup>a</sup>	7,658	79,630	86,090

<sup>ab</sup> Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ )

**TABLA Nº 2. Ganancia de peso total durante el período de recría a beneficio (Kg.) por grupo y sexo.**

GRUPOS	SEXO	Media	Desviación Estándar	Intervalo de Confianza 95%	
				Valor mínimo	Valor máximo
Tratamiento 1	hembra	86,740 <sup>a</sup>	8,407	82,172	91,308
	macho	86,687 <sup>a</sup>	8,495	82,118	91,255
Tratamiento 2	hembra	81,140 <sup>a</sup>	9,796	76,572	85,708
	macho	85,467 <sup>a</sup>	10,761	80,898	90,035
Control	hembra	82,120 <sup>a</sup>	7,070	77,552	86,688
	macho	83,600 <sup>a</sup>	8,386	79,032	88,168

<sup>ab</sup> Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ )

**TABLA Nº 3. Resultados de parámetros productivos obtenidos del estudio.**

PARAMETROS	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Control
Ganancia diaria de peso	0,686	0,671	0,647
Índice de Conversión Alimenticia	2,323	2,358	2,452

**TABLA N° 4.** Título de anticuerpos de *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos provenientes de madres no vacunadas durante el periodo de recría hasta el beneficio.

DIAS	GRUPO CONTROL		TTO 1 (Vac 35/56 días)		TTO 2 (Vac 42/56 días)	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
21	2,6717 <sup>a</sup>	0,5863	2,5993 <sup>a</sup>	0,6577	1,9603 <sup>b</sup>	12,021
35	2,4253 <sup>a</sup>	0,4087	2,5327 <sup>a</sup>	0,5927	1,8110 <sup>b</sup>	0,7135
70	1,6353 <sup>b</sup>	0,6444	3,3420 <sup>a</sup>	0,2824	3,1520 <sup>a</sup>	0,3673
91	2,1490 <sup>b</sup>	0,6616	3,2643 <sup>a</sup>	0,2691	3,1480 <sup>a</sup>	0,2970
112	2,3223 <sup>b</sup>	10,235	3,1343 <sup>a</sup>	0,3164	3,2930 <sup>a</sup>	0,2407
145	3,1567 <sup>b</sup>	0,2481	3,4423 <sup>a</sup>	0,2292	3,4520 <sup>a</sup>	0,1815

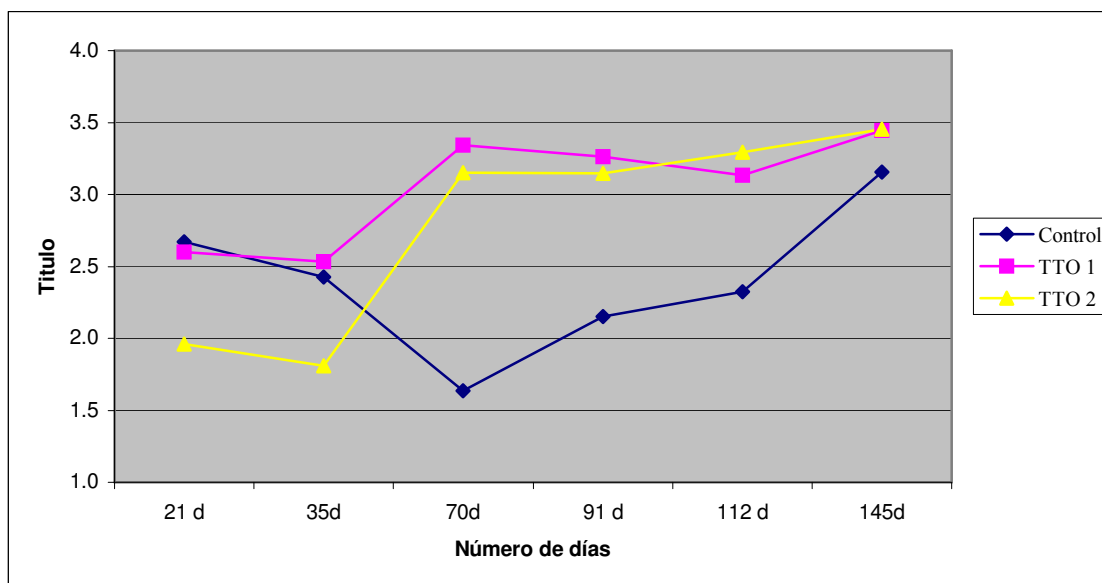
<sup>ab</sup> Los promedios son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ )

DS = Desviación estándar

Vac = Vacunados

TTO = Tratamiento

**GRAFICO N° 1.** Título de anticuerpos de *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos provenientes de madres no vacunadas durante el periodo de recría hasta el beneficio.



## V. DISCUSIÓN

En el estudio realizado se encontró que no hubo diferencia significativa en la ganancia de peso total entre los diferentes grupos experimentales. A pesar de que el tratamiento 1 obtuvo una diferencia a favor de 3.854 Kg. con respecto al grupo control, visiblemente mejor que el tratamiento 2 (el cual fue de 0.443 Kg.), esta diferencia no fue estadísticamente significativa. A pesar de esto, los valores obtenidos en la ganancia de pesos, están dentro del rango obtenidos en otros estudios en donde se utilizaba también vacuna inactivada. Así, se muestran diferencias a favor de los vacunados que van desde los 2.86 Kg. (Perfumo *et al* ,1995) hasta los 8 Kg. (Andrada *et al* , 2003). Las diferencias a favor de los animales vacunados resultan ser mayores cuanto mayor sea el problema de neumonía enzoótica porcina de la granja de que se trate, pues al influir otros factores además del sanitario, ante una afección severa, la vacuna produce mejoras importantes en el crecimiento, como muestran los diversos estudios mencionados.

Estos resultados concuerdan con los de Thacker (2001) y Escobar *et al.* (2002) quienes no encontraron diferencia en la ganancia de peso de los animales durante el período de experimentación, aunque Escobar *et al.* (2002) solo evaluaron los animales en la etapa de recría (donde la ganancia de peso es menor, en comparación con la etapa de engorde) lo que pudo haber influido en sus resultados finales.

La ganancia de peso con relación a las variables por grupo y sexo (Tabla 2), no muestra una diferencia estadística significativa; sin embargo, se puede apreciar que hay una tendencia fisiológica esperada a obtener mayor peso en los animales del sexo macho, en ambos tratamientos. La diferencia en aumento de peso a favor de los machos es parte de la genética de los animales ya que existe un dimorfismo sexual, es así que diversos estudios realizados a través de los años evaluaron que los cerdos machos obtienen mejor peso corporal que las hembras (Blood *et al.*, 2000). De esto se puede deducir que existe un impacto económico positivo para los animales del sexo macho.

Durante el estudio hubo una incidencia de diarreas en la etapa de recría el cual afecto a los diferentes grupos experimentales (Anexo 2), el cual mermó la condición corporal de los animales. A pesar de que no existió mortalidad en ninguno de los grupos, la morbilidad alcanzo hasta un 40% para el tratamiento 1, 36.6 % para el 2 y 26.6 % para el control. Aunque estadísticamente no existen diferencias entre los grupos afectados por diarrea, este factor pudo haber influenciado en una mejor evaluación de los tratamientos propuestos. Staerk *et al* (1997) menciona diferentes factores de riesgo que tienen impacto sobre las enfermedades respiratorias, y entre ellas se menciona a las diarreas. Otro factor que pudo haber influenciado es la disposición de los animales en una misma sala de recría el cual pudo haber disminuido la presión de infección en los animales del grupo control, y por lo tanto no haberse afectado tanto.

En el presente trabajo, el índice de conversión alimenticia (ICA) establece una tendencia a favor de los animales vacunados con una disminución de 0.129 y 0.094, para los tratamientos 1 y 2 respectivamente comparados con el control, lo que supone un 5.26 % y de 3.83% de mejora. Estos valores son mayores que el 0.07 obtenido por Maes *et al* (1996) y cercanos al 0.1 encontrado por Martinod (1996). Pallares *et al* (1999) demostraron una disminución del 0.083 (3.27%) con un programa de vacunación de dos dosis a la primera y tercera semana de edad, el cual es similar al presente estudio.

Aún cuando la ganancia de peso no fue estadísticamente significativa, la ganancia diaria de peso (GDP), uno de los mas importantes índices biológicos, mostró un aumento a favor de los animales vacunados de 39 gr. y 24 gr. para los tratamientos 1 y 2 con respecto al control (Tabla 3), lo cual significa un 5.7% y 3.9% de mejora respectivamente. Estos valores son menores que los encontrados en la bibliografía de pruebas de campo con bacterinas de Mycoplasma, que llegan en algunos casos a superar los 40 gramos (Charlier *et al*, 1994; Martinod, 1996), a excepción de la prueba realizada por Lium *et al* (1994) donde el crecimiento fue de -10 gramos para los animales vacunados, debido posiblemente a cuadros lesionales que pudieran estar circunscritos y no influir en el estado general y apetito de los animales. Siugzdaite y Garlaite (2002), demostraron una ganancia de peso de 28 gramos para el grupo vacunado con bacterina de Mycoplasma con un programa de vacunación de dos dosis, a la primera y tercera semana.

En cuanto a los títulos de anticuerpos (Tabla 4), al inicio del estudio, se encontró diferencia estadística significativa entre el tratamiento 1 y el 2, pero no con el tratamiento 1 y el control. Es decir no hubo una inmunidad materna homogénea, porque existieron madres que por no estar vacunadas presentaron diferentes niveles de anticuerpos, reflejándose en la variabilidad de títulos en sus crías. De igual modo, Clark (1999) demostró que es posible observar diferencias en los niveles de anticuerpos entre individuos de diferentes camadas e inclusive entre hermanos de camada.

Además, la diferencia entre camadas se explicaría porque en las marranas el nivel de anticuerpos contra *M. hyopneumoniae* varía con el número de partos. Mientras que la diferencia en los niveles iniciales de anticuerpos entre hermanos de camada puede deberse a un mal manejo del lechón al nacimiento en lo que respecta a la ingestión de calostro. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos por Thacker (1997), quien dice que el nivel y duración de los anticuerpos maternos son extremadamente variables entre individuos y hatos.

Los diferentes grupos experimentales fueron seropositivos al inicio del estudio (tercera semana de vida) lo cual nos indicaría que habría una transferencia de anticuerpos maternos a los lechones, a pesar de que estos procedían de marranas no vacunadas. De lo cual se deduce, que dentro de la granja había marranas infectadas durante el período de gestación y que el *M. hyopneumoniae* se encontraba en constante movimiento en las instalaciones, incluso favorecido por el sistema de manejo de la granja de un solo sitio, el cual permite al microorganismo infectar a los animales de recría, engorde y gestación. Asimismo, Torres (2003) al trabajar con lechones de madres no vacunadas, encontró un 100% de seropositivos al inicio de su estudio (1° semana) relacionando este hecho a la gran actividad del patógeno dentro de la granja que estudio.

Del grafico 1, en el grupo control, se puede observar que los anticuerpos maternos descienden hasta las diez semanas de edad posiblemente por la alta inmunidad pasiva brindada por las madres infectadas naturalmente. Estos resultados difieren de lo encontrado por Calle *et al* (2003) y Torres (2003) quienes observaron que los anticuerpos transmitidos por las madres no vacunadas y expuestas naturalmente, persisten hasta la sexta u octava semana de edad respectivamente; sin embargo,

Wallgren *et al* (1998) mencionaron que los títulos de anticuerpos pueden decaer en algunos casos a las dos semanas de edad y en otros pueden persistir hasta 6.5 a 9 semanas de edad.

Los animales sometidos a inmunización con bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* mostraron una elevación en el título de anticuerpos como respuesta a la doble vacunación, existiendo diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control, mas no entre ambos tratamientos propuestos. Este aumento se notó a las 2 semanas post vacunación siendo su pico máximo a las 5 semanas. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Stijar *et al* (1996), quienes mencionaron que la respuesta serológica para animales vacunados se puede encontrar de 2 a 4 semanas, aunque es probable que en algunos cerdos no haya seroconversión post-vacunación. De otro lado, los títulos de anticuerpos tienen una duración determinada dependiendo de varios factores como cantidad antigénica de la dosis vacunal, día de inmunización, estado del animal, respuesta individual, entre otros.

El aumento del título de anticuerpos en las últimas semanas (Gráfico 1) para ambos grupos y el control, antes del beneficio, hace notar que los animales han sido expuestos con esta bacteria, es decir, ha existido una interacción con el agente en la etapa de engorde. Esto corroboraría con lo afirmado por Janke (1997), quien menciona que los cerdos sufren mayor presión de la enfermedad en la etapa de recría y posteriormente, en la etapa de engorde. Esto lleva a una respuesta serológica de 2 a 4 semanas posteriores a la infección, y aún ésta permanece en un nivel considerable por un período cercano a los tres meses (Moore *et al.*, 1997).

Al evaluar el grado de consolidación pulmonar general se observó que no hubo diferencia estadística significativa entre los tratamientos propuestos, ya que ambos estuvieron dentro de los índices esperados (IDN= 0.55), índices considerados como “hatos libres de neumonía”; sin embargo, al evaluarlos por separado contra el grupo control, la diferencia si fue estadísticamente significativa (IDN= 1.27). Estos resultados de la evaluación pulmonar nos sugieren que los animales vacunados con la bacterina experimentaron menos patologías pulmonares que el grupo no vacunado (control), y por lo tanto reducción en la vulnerabilidad económica del mercado de cerdos de engorde de grandes inversiones. De otro lado, las extensiones de las lesiones neumónicas tendieron a ser mayores entre los porcinos que seroconvirtieron temprano durante el período de

crianza. Las infecciones con *Mycoplasma hyopneumoniae* adquiridas tempranamente, presumiblemente fortalecidas con infecciones secundarias y el medio ambiente mal manejado, disminuyeron la ganancia de peso en los cerdos.

Finalmente, se resume que hubo una mejor respuesta en los animales inmunizados de ambos tratamientos, sobre el título de anticuerpos, pero que no influyó en la ganancia de peso, debido probablemente a diversos factores de riesgo tal como lo fue el manejo compartido en una misma sala de recría, lo cual pudo haber disminuido la presión de infección en los animales no vacunados, además de la incidencia de diarreas en la etapa de recría, lo cual dificultó una mejor comparación entre los tratamientos propuestos. Es necesario seguir desarrollando una constante investigación en este campo hasta determinar los factores que estarían causando una pobre eficacia de las vacunaciones.

## **VI. CONCLUSIONES**

- El título de anticuerpos mostró diferencia significativa en ambos grupos vacunados con respecto al control, luego de las vacunaciones.
- No hubo diferencia estadística significativa por efecto de los tratamientos en relación a la ganancia de peso.
- Existe una tendencia positiva fisiológica en los animales del sexo macho con respecto a las hembras en tener mayor ganancia de peso, lo cual refleja un mejor impacto económico.
- No se encontró diferencias en los títulos de anticuerpos entre los grupos vacunados.
- Las lesiones pulmonares disminuyeron en ambos tratamientos respecto al grupo control, obteniendo índices de neumonía menores a 0.55.

## VII. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Ackermann, MR; DeBey, MC; DeBey, BM. 1991. Bronchiolar metaplasia and Ulex europaeus agglutinin I (UEA-I) affinity in *Mycoplasma hyopneumoniae*-infected lungs of six pigs. *Vet. Pathol.* 28: 533-535.
- Almagor, M; Kahane, I; Gilon, C; Yatziv, S. 1986. Protective effects of the glutathione redox cycle and vitamin E on cultured fibroblasts infected by *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect Immun* 52: 240-244.
- Amanfu, W; Weng, CN; Ross, RF; Barnes, HJ. 1984. Diagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine: sequential study by direct immunofluorescence. *Am. J. Vet. Res.* 45:1349-1352.
- Amass, SF.; Clark, LK.; Van Alstine, WG.; Bowersock, TL.; Murphy, DA.; Knox, KE. y Albregts, S.R. 1994. Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida* infections in swine. *JAVMA*, 204(1):102-7.
- Armstrong, CH., Freeman, MJ., Freeman, LS., Lopez-Osuna, M., Young, T., Runnel, LJ. 1983. Comparison of the enzyme-linked immunoabsorbent assay and the indirect hemmagglutination and complement fixation tests for detecting antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Can. J. Comp. Med.* 47:464-470.
- Andrada, M; Assuncao, P; De la Fé, C; Fernández, A; Bóveda, JB. 2001. Etiología de la Neumonía Enzoótica Porcina, Agentes Asociados y Epidemiología. Capítulo II. Facultad de Veterinaria. Universidad de las Palmas de Gran Canaria, Arucas. Gran Canaria. p: 31 – 45.
- Andrada, M; Espinosa, A; Rodríguez, F; Herráez, P; Fernández, A. 2003. Estrategias de intervención y costo de la neumonía enzoótica porcina. *Porci*, 74: 89-103.
- Bazer FW., Ford JJ., Kesinger, RS. 2001. Reproductive Physiology. Chapter 5. In: *Biology in Domestic pig*. Editors Pond W.G. & Mersmann H.G. Cornell University Press, Ithaca. p. 150-224.
- Bej, AK; Mahbubani, MH; Atlas, RM. 1991. Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their application. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26:301-334.

- Bereiter, M; Young, TF; Joo, HS; Ross, RF. 1990. Evaluation of the ELISA and comparison to the complement fixation test and radial immunodiffusion enzyme assay for detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine serum. *Vet. Microb*; 25: 177- 192.
- Bhogal, BS; Dayalu, KI; Reich, RL. 1992. Preferential stimulation of cell mediated immune (CMI) responses in bronchial lymph nodes (BLN) of pigs vaccinated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *IPVS. Proc*: 298.
- Blanchard, B; Vena, MM; Cavalier, A; Le Lannic, J; Gouranton, J; Kobisch, M. 1992. Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Microbiol.* 30:329-341.
- Blood, DC.; Radostits; O.; Hincheliff, K.; Gay, C. 1999. *Medicina Veterinaria*. 9ª ed., *Ed. Interamericana Mc Graw Hill*, Madrid. Vol III. p: 1195-1204.
- Blood, DC.; Radostits, O.; Clive, D. Hincheliff, K. 2000. *Medicina Veterinaria, Tratado de las enfermedades del Ganado bovino, porcino, caprino y equino*. 9º Ed. Vol. I. Madrid, España. Ed. Mc Graw Hill. p. 1195-1204.
- Bolske, G; Strandberg, ML; Bergstrom, K; Johansson, KE. 1987. Species-specific antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae* and cross-reaction with other porcine mycoplasma. *Curr Microbiol* 15:233-239.
- Bommeli, WR. y Nicolet, JA. 1983. A method for the evaluation of the enzyme-linked immunoassay results for diagnosing enzootic pneumonia in pig herds. *Proceedings of the Third International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians 1983*, 2, 439- 442.
- Brown, S; Teplitz, M; Revel, J. 1974. Interaction of mycoplasmas with cell cultures as visualized by electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71: 464-468.
- Burch, D. 2003. *Mycoplasma vaccines & Passive inmunity the effect of maternally deliveres antibodies and piglet age vaccinal response*. *Pig World*.14:48-49.
- Calle, ES.; Camacho, SC.; Torres, AM.; Falcón, PN.; Ceron, C.M.; Zacarías, RE. 2003. Inmunidad natural e inducida contra *Mycoplasma hyopneumoniae* mediada desde el nacimiento hasta la edad de mercado en cerdos bajo crianza tecnificada. *Mun. Avi. y Porc.*, 44: 48-49.
- Calsamiglia, M., Pijoan, C., Bosch, G. J. 1999. Profiling *Mycoplasma hyopneumoniae* in farms using serology and a nested PCR technique. *Swine Hlth. Prod.* 7:263-268.
- Camacho, C. y Calle, S. 2003. Neumonía Enzoótica Porcina. *Mun. Avi. Y Porc.*, 45: 48-50.

- Caron, J; Ouardani, M; Dea, S. 2000a. Diagnosis and Differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* Infections in Pigs by PCR Amplification of the p36 and p46 Genes. *Journal of Clinical Microbiology*; 38 (4): 1390-1396
- Caron, J; Sawyer, N; Ben Abdel Moumen, B; Cheikh Saad Bouh, K; Dea, S. 2000b. Species-Specific Monoclonal Antibodies to Escherichia coli-Expressed p36 Cytosolic Protein of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*; 7(4): 528-535.
- Carter, GR. 1991. *Bacteriología y Micología Veterinaria: Aspectos Esenciales. Manual Moderno: México.* p: 288-291.
- Caruso, JP. y Ross, RF. 1990. Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* infections on alveolar macrophage functions in swine. *Am J Vet Res.*; 51(2): 227-31.
- Casique, PS. 2002. *Mycoplasma hyopneumoniae*: Nuevos hallazgos en el mecanismo de acción en la respuesta celular inmune. *Boletín Técnico Pfizer Salud Animal.*
- Charlier, P.; Jambers, B.; Martinod, S.; Legrand, A. 1994. Efficacy of Stelamune™ *Mycoplasma* in European field trials. *Proc. 13<sup>th</sup> Internl. Pig Veterinary Society Congress Bangkok, Thailand.* p.p.136.
- Chen, JR.; Lin, JH.; Weng, CN.; Lai, SS. 1998. Identification of a novel adhesin-like glycoprotein from *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol*; (62): 97 – 110.
- Chen, YL; Wang, SN; Yang, WY; Chen, YJ; Lin, HH; Shiuan, D. 2003. Expression and Immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* Heat Shock Protein Antigen P42 by DNA Vaccination. *Infect Immun*; 71(3): 1155–1160.
- Chou, SY; Chung, TL; Chen, RJ; Ro, LH; Tsui, PI; Shiuan, D. 1997. Molecular cloning and analysis of a HSP (Heat Shock Protein)-like 42 kDa antigen gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Biochem Mol Biol Int*; 41: 821 – 831.
- Chung, TL.; Farh, L.; Chen, YL.; Shiuan, D. 2000. Molecular cloning and characterization of a unique 60 kDa/72 kDa antigen gene encoding enzyme I of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system (PTS) of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Biochem (Tokyo)*; 128(2): 261-9.
- Ciprian, A.; Pijoan, C.; Cruz, T; Camacho, J.; Tortora, J.; Colmenares, G.; Lopez, R.; Garza de la, M. 1988. *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. *Can. J. Vet.Res.*, 52: 434–438.

- Clark, K. 1997. Control or eradication of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Proceedings of the Iowa State University Veterinary Medicine Seminar. p: 8 – 10.
- Clark, K. 1999. *Mycoplasma hyopneumoniae*: serology/ vaccinology. Proceedings of the American Association of Swine Practitioners Conference. St. Louis. p: 339 – 343.
- Clark, K. 2000. Mycoplasmal Pneumonia Control Strategies. Proceedings Lemman Swine Conference; 27: 87-91.
- Copes, J.; Nievas, F.; Cerda, R. Y Perfumo, C. 1995. Aislamiento y caracterización de *Mycoplasma* sp de pulmones de cerdos provenientes de mataderos. *Analecta Veterinaria*, 15 (1)27-30.
- Cornaglia, E. 2002. *Mycoplasma hyopneumoniae* titration: A powerful tool to understand antibody levels. Proceedings of the 33rd annual meeting of the American Association of Swine Veterinarians, Kansas City, 83.
- Daniel, W. 1996 Bioestadística base para el análisis de las ciencias de la salud. Editorial Limusa, pp. 139-170.
- Dalla Costa, OA.; Mores, N.; Sobestiansky, J.; Barioni Junior, W.; Piffer, I.A.; Paiva, D.P.; Amaral, A.L.; Guzzo, R. 2000. Fatores de risco asociados a rinite trófica progresiva e pneumonias crónicas nas fases de crescimento e terminacao. Concordia. EMBRAPA-CNPSA. Comunicado Técnico, 267.
- DeBey, MC; Jacobson, CD; Ross, RF. 1992. Histochemical and morphologic changes of porcine airway epithelial cells in response to infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.* 53: 1705-1710.
- DeBey, M; Roth, JA; Ross, RF. 1993. Enhancement of the increase in intracellular calcium concentration in stimulated neutrophils by *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Res. Commun.* 17: 1481-1488.
- DeBey, MC y Ross, RF. 1994. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infect Immun* 62: 5312-5318.
- Desrosiers, R. 2001. A review of some aspects of the epidemiology, diagnosis, and control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections. *J Swine Health Prod* 9(5):233-237.
- Done, S. 1991. Enviromental factors affecting the severity of pneumonia in pigs. *Vet Rec*, 128: 582-586.
- Done, S. 1997. Enzootic pneumonia (mycoplasmosis) revisited. *The pig Journal*.
- Done, S. 2002. How respiratory pathogens damage the pig?. *Pig International*, 32:35-36.

- Doster, AR y Lin, BC. 1988. Identification of *Mycoplasma hyopneumoniae* in formalin-fixed porcine lung, using an indirect immunoperoxidase method. *Am J Vet Res* 49: 1719-1721.
- Escobar, J.; Van Alstine, W.; Baker, D.; Jonson, R. 2002. Growth performance and whole-body composition of pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *American Society of Animal Science*. 80: 384-391.
- Espuña, E.; Riera, P.; Artigas, C.; Ferrés, J.; Alemany, R. 1994. Activity of an adjuvant based on Levamisole, used as a diluent of a live freeze-dried vaccine against Aujeszky's disease. *Med Vet*, 11(6): 34-36.
- Feld, NC.; Qvist, P.; Ahrens, P.; Friis, NF; Meyling, A. 1992. A monoclonal blocking ELISA detecting serum antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol.*; 30(1): 35-46.
- Frey, J; Haldimann, A; Kobisch, M; Nicolet, J. 1994. Immune response against the L-lactate dehydrogenase of *Mycoplasma hyopneumoniae* in enzootic pneumonia of swine. *Microb. Pathog.* 17:313-322
- Friis, NF. y Szancer, J. 1994. Sensitivity of certain porcine and bovine mycoplasmas to antibacterial agents in a liquid medium test compared to a disc assay. *Acta Vet. Scand*; 35: 389-394.
- Fuentes, M. 2000. "Entendiendo el complejo respiratorio porcino". *Venezuela Porcina*. En [http://www.e-campo.com/sections/news/display.php/uuid.46914\\_DF4\\_-3E3D-11D4-A53C0006292E2740/](http://www.e-campo.com/sections/news/display.php/uuid.46914_DF4_-3E3D-11D4-A53C0006292E2740/) . Viernes, 02 de Julio del 2004.
- Gardner, IA. y Hird, DW. 1990. Host determinants of pneumonia in slaughter weight swine. *Am J Vet Res*, 51(8)1306-11.
- Goodwin, RFW. 1984. Apparent reinfection of enzootic pneumonia-free pig herds: early sign and incubation period. *Vet. Rec.* 115:320-324.
- Goodwin, RFW. 1985. Apparent reinfection of enzootic pneumonia-free pig herds: search for possible causes. *Vet. Rec.* 116:690-694.
- Halbur, PG. 1997. Making the diagnosis with Serology, antigen detection and PCR. *Proceedings of the Iowa State University Veterinary Medicine Seminar*. p: 3- 7.
- Halbur, PG. 1998. Porcine respiratory disease. *Proc Int Pig Vet Soc Congr* 15:1-9.
- Haldimann, A; Nicolet, J; Frey, J. 1993. DNA sequence determination and biochemical analysis of the immunogenic protein p36, the lactate dehydrogenase (LDH) of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.* 139: 317-323.

- Hannan, PCT; Windsor, HM; Ripley, PH. 1997. In vitro susceptibilities of recent field isolates of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyosynoviae* to valnemulin (Econor®), tiamulin and enrofloxacin and the in vitro development of resistance to certain antimicrobial agents in *Mycoplasma hyopneumoniae*. Res. Vet. Sci.; 63: 157-160.
- Harasawa, R; Koshimizu, K; Takeda, O; Uemori, T; Asada, K. y Kato, I. 1991. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by the polymerase chain reaction. Mol. Cell. Probes 5:103-109
- Hill, MA.; Scheidt AB.; Teclaw RF.; Clark, LK.; Knox. KE. y Jordan, M. 1992. Association between growth indicators and volume of lesions in lungs from pigs at slaughter. *Am J Vet Res*, 53(1)2221-3.
- Hsu, T; Artiushin, S; Minion, C. 1997. Cloning and Functional Analysis of the P97 Swine Cilium Adhesin Gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Journal of Bacteriology; Feb: 1317–1323
- Hsu, T y Minion, C. 1998. Identification of the Cilium Binding Epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 Adhesin. Infect Imm; 66(10): 4762-4766.
- Huallanca, A.; Hung, A.; Noé, MN.; Suarez, AF. 2001. *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos beneficiados en un matadero de Lima Metropolitana. Rev. Inv. Vet. Perú, 12(1).
- Ibarra, M.; Noe, N.; Alvarado, A.; Perales, R. 2000. Evidencia de la presencia de anticuerpos de *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos provenientes de granjas de crianza artesanal del sur de Lima. Rev. Inv. Vet. Perú; 11 (2): 164 – 168.
- Jayappa, H.; David, R.; Rapp-Gabrielson, V.; Wasmoen, T.; Thacker, E. and Thacker, B. 2001. Evaluation of the efficacy of *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin following immunization of young pigs in the presence of varying levels of maternal antibodies. Proceedings, American Association of Swine Veterinarians 32<sup>nd</sup> annual: 237-241.
- Janke, B. 1997. Pathogenesis of Mycoplasmal pneumonia, samples for diagnosis. Proceedings of the Iowa State University Veterinary Medicine Seminar. p: 1,2.
- Joo, HS; Suh, DK; Rutten, S. 1988. Evaluation of control protocols for *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in swine farms. *Sci/Vet Med Bldg*
- Kavanagh, NT. 1992. The finishing pig: improving health and productivity. Pig Vet. J.; 29: 70- 88.

- King, KW; Faulds, DH; Rosey, EL; Yancey, RJ. 1996. Characterization of the gene encoding Mhp1 from *Mycoplasma hyopneumoniae* and examination of Mhp1's vaccine potential. *Vaccine*; 15:25–35.
- Kobisch, M. y Friis., N. 1996. Swine mycoplasmoses. *Rev Sci Tech*, 15(4):1569-605.
- Kobisch, M.; Blanchard, B.; Le Potier, M. 1993. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and resistance to reinfection. *Vet Res*, 24(1):67-77.
- Kwon, D; Choi, C; Chae, C. 2002. Chronologic Localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Experimentally Infected Pigs. *Vet Pathol* 39: 584-587
- Kuhn, M. 2000a. Respisure one: Duración de la inmunidad en cerdos jóvenes con anticuerpos maternos contra *Mycoplasma hyopneumoniae*. Boletín Técnico. Pfizer Salud Animal. New York.
- Kuhn, M. 2000b. Duración de la inmunidad a *Mycoplasma hyopneumoniae* luego de una sola dosis de Respisure One. Boletín Técnico. Pfizer Salud Animal. New York.
- León, E. A.; Madec, F.; Taylor, N. M.; Kobisch, M. 2001. Seroepidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig from farrow to finish farms. *Vet Microbiol*; 78 (4): 331-334.
- Lium, B.; Lund, A. y Skomsky, A. 1994. A field study on vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. *IPVS*, 13:191.
- Livingston, CW; Stair, EL; Underdahl, NR; Mebus, CA. 1972. Pathogenesis of mycoplasmal pneumonia in swine. *Am. J. Vet. Res.* 33: 2249-2258.
- Maes, D; Verdonck, M; Deluyker, H; De Kruif, A. 1996. Enzootic pneumonia in pigs. *Vet. Quart.* 18:104-109.
- Martinod S, 1996. Protection against *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections using a mycoplasma inactivated vaccine Respisure under field conditions. Proc. 14<sup>th</sup> IPVS Congress, Bologna,221.
- Messier, S; Ross, RF; Paul, PS. 1990. Humoral and cellular responses of pigs inoculated with *Mycoplasmas hyopneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.* 51:52-58
- Messier, S. y Ross, RF. 1991. Interactions of *Mycoplasma hyopneumoniae* membranes with porcine lymphocytes. *Am J Vet Res* 542: 1497-1502
- Mebus, CA. y Underdahl, NR. 1977. Scanning electron microscopy of trachea and bronchi from gnotobiotic pigs inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.* 38:1249-1254.

- Moore, C; Daigneault, J; Hoover, T. 1997. Efficacy of different strategies of *Mycoplasma* vaccination as measured by serology. In Proceedings of American Association Swine Practitioners. p: 135 – 136.
- Mori, Y, Hamaoka, T; Sato, S. 1987. Use of monoclonal antibody in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Isr. J. Med. Sci.*; 23:657-662
- Mori, Y; Hamaoka, T; Sato, S; Takeuchi, S. 1988. Immunoblotting analysis of antibody response in swine experimentally inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Immunol. Immunopathol*; 19:239-250
- Morris, CR; Gardner, IA; Hietala, SK; Carpenter, TE; Anderson, RJ; Parker, KM. 1995. Seroepidemiologic study of natural transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in a swine herd. *Prev. Vet. Med*; 21: 323-337.
- Morrison, R. B.; Pijoan C.; Hilley, H. D.; Rapp, V. 1985. Microorganism associated with pneumonia in slaughter weight swine. *Can. J. Comp. Med.*, 49: 129-137.
- Neyrolles, OI; Chambaud, S; Ferris, M; Provost, M; Savak, T, Montaignen, L; Blanchard, A. 1999. Phase variations of *Mycoplasma penetrans* major surface lipoprotein increase antigenic diversity. *Infect Immun*; 67: 1569-1578.
- Nicolet, J.; Paroz, P.; Bruggmann, S. 1980. Tween 20 soluble proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* as antigen for an enzyme linked immunosorbent assay. *Res Vet Sci.*; 29(3): 305-9.
- Otto, EK. 1991. Enfermedades del cerdo en explotación intensiva. Edimed: España. p: 22-23.
- Pallares FJ, Gomez S, Muñoz A, 1999. Monitorización Zootécnico-económico del uso de una vacuna frente a neumonía enzoótica porcina en condiciones de campo. *Arch. Zootec.* 48: 371-382.
- Park, SC.; Yibchok-Anun, S.; Cheng, H.; Young, TF.; Thacker, EL.; Minion, FC.; Ross, RF.; Hsu, WH. 2002. *Mycoplasma hyopneumoniae* increases intracellular calcium release in porcine ciliated tracheal cells. *Infect Immun.*; 70(5): 2502-6.
- Perfumo, CJ, Sanguinetti R, Risso MA, Copes J, Petruccelli MA, Perez RA y Delas F, 1995. Evaluación en condiciones de campo de la vacuna Respisure® contra *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Terrizo* 24: 190-196.
- Piffer, I.A. y Britto, J.R.F. 1991. Descrição de um modelo para avaliação e quantificação de lesões pulmonares de suínos e formulação de um índice para classificação dos rebanhos. *Concordia, SC, EMBRAPA-CNPISA, Documento, 23.* p12.

- Pijoan, C. 2002. Update on Mycoplasma Research at the SDEC. In: [http://academicserver.cvm.umn.edu/sdec/Update\\_on\\_Mycoplasma\\_research\\_at\\_the\\_SDEC.pdf](http://academicserver.cvm.umn.edu/sdec/Update_on_Mycoplasma_research_at_the_SDEC.pdf).
- Plonart, H. y Bickhardt, K. 2001. Manual de enfermedades del cerdo. Acribia: España. pg: 141 – 147.
- Poveda, BJ.; Ramírez, SA.; De la Fé, C.; Assunção, P. y Díaz-Bertrana, L. 2002. Manual de Microbiología Veterinaria. McGraw Hill-Interamericana. Págs: 423-430.
- Rautiainen, E; Virtala, AM; Wallgren, P; Saloniemi, H. 2000. Varying effects of infections with *Mycoplasma hyopneumoniae* on the weight gain recorded in three different multisource fattening pig herds. *Journal of Veterinary Medicine*; 47 (6): 461-469.
- Rautiainen, E. 2001. *Mycoplasma hyopneumoniae* – Aspects of epidemiology, protection and control. Faculty of Veterinary Medicine of the University of Helsinki. Finland. June 20<sup>th</sup>.
- Razin, S. y Jacobs, E. 1992. Mycoplasma adhesion. *J. Gen. Microbiol.* 138:407–422.
- Roberts, ED; Switzer, WP; L'Ecuyer, C. 1962. Influence of *Pasteurella multocida* and *Mycoplasma hyorhinis* (PPLO) on the histopathology of field cases of swine pneumonia. *Cornell Vet.* 52:306-327.
- Rosengarten, R. y Wise, KS. 1991. The Vlp system of *Mycoplasma hyorhinis*: combinatorial expression of distinct size variant lipoproteins generating high-frequency surface antigenic variation. *J. Bacteriol.* 173: 4782– 4793.
- Ross, RF. 1986. Mycoplasmal disease, *In* A. D. Leman, B. Straw, R. D. Glock, W. L. Mengeling, R. H. C. Penny, and E. Scholl (ed.), *Diseases of swine*, 6th ed. Iowa State University Press, Ames. p. 469–483.
- Ross, RF. 1992. Mycoplasmal diseases. *In* A. D. Leman, B. Straw, W. L. Mengeling, S. D'Allaire, and D. J. Taylor (ed.), *Diseases of swine*, 7th ed. Iowa State University Press, Ames. p. 537-551.
- Ross, RF. 1999. Mycoplasmal diseases. *In: Diseases of swine, 8th edition.* Iowa State University Press, Ames. p. 495-510.
- Ross, RF. 2000. Enfermedades micoplásmaticas. *En: Enfermedades del cerdo.* 8va ed. Vol 1. Capítulo 31. Interamericana: Buenos Aires-Argentina.
- Rottem, S. y Naot, Y. 1998. Subversion and exploitation of host cells by mycoplasmas. *Trends in Microbiology*; 6(11): 436-440.
- Rottem, S. 2003. Interaction of Mycoplasmas With Host Cells. *Physiol. Rev.* 83: 417-432.

- Scheidt, A; Mayrose, VB; Hill, MA. 1990. Relationship of growth performance to pneumoniae and atrophic rhinitis detected in pigs at slaughter. J Am Vet Med Assoc; 196: 881 – 884.
- Sherm, B; Gerlach, GF; Runge, M. 2002. Analysis of heat shock protein 60 encoding genes of mycoplasmas and investigations concerning their role in immunity and infection. Vet Microbiol; 89: 141- 150.
- Siugzdaite, J. y Garlaite, K. 2002. Effect of Vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in a Pig Herd from Birth to Slaughter. Acta Vet. Brno 71: 549–553.
- Sheldrake, RF. y Romalis, LF. 1992. Evaluation of an enzyme- linked immunosorbent assay for detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* antibody in porcine serum. Aust. Vet. J., 69 (10): 255 – 258.
- Snedecor, G.W. and Cochran, W.G. 1986. Statistical Methods, 7<sup>th</sup> edition. Edit: The Iowa State University. ISBN: 8138-1560-6.
- Staerk, K. D., Nicolet, J., Frey, J. 1997. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by air sampling with nested PCR assay. Appl. Environ. Microbiol. 64(2):543-548.
- Stevenson, GW. 1999. Common mistakes in interpretation of population serology. Proc. of the American Association of Swine Practitioners. St. Louis. P: 339 – 343.
- Stijar, M; Noyes, E; Moreso, JM; Fernández de Aragon, J; Pijoan, C. 1996. Relationship among seroconversión to *Mycoplasma hyopneumoniae*, lung lesions, and production parameters in pigs. Swine Hlth Prod. 4:273-277.
- Stipkovits, L; Nicolet, J; Haldimann, A; Frey, J. 1991. Use of antibodies against the p36 protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* for the identification of M. hyopneumoniae strains. Mol. Cell. Probes 5:451-457
- Stipkovits, L. 1995. Neumonía por Micoplasma en el cerdo PIGS-Misset, Sep: 18-19.
- Strasser, M., J. Frey, G. Bestetti, M. Kobisch, and J. Nicolet. 1991. Cloning and expression of a novel species-specific early immunogenic 36-kilodalton of *Mycoplasma hyopneumoniae* in *Escherichia coli*. Infect. Immun. 59:1217-1222
- Surprenant, Ch. 2001. *Mycoplasma hyopneumoniae*: serologic interpretation of herd profiles. Proceedings of the 32nd Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians. Nashville. P. 477.
- Suter, M., Kobisch, M., Nicolet, J. 1985. Stimulation of Immunoglobulin-containing cells and isotype -specific antibody response in experimental *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in specific-pathogen-free pigs. Infect. Immun. 49:615-620.

- Thacker, EL. 1997. Mycoplasma vaccines: What are Know, what we don't know. Proceedings of the Iowa State University Veterinary Medicine Seminar. P: 11 – 13.
- Thacker, EL. 1999a. Current status of Mycoplasma Vaccination. Proceedings of the Swine Disease Conference for swine practitioners. Iowa. p: 69 - 71
- Thacker, EL. 1999b. Mycoplasma research efforts – What are we learning?. Proc. of the Swine disease Conference for swine practitioners. Iowa. P: 107- 111.
- Thacker, E; Halbur, P; Ross, R; Thanawongnuwech, R; Thacker, B. 1999. *Mycoplasma hyopneumoniae* Potentiation of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus-Induced Pneumonia. Journal of Clinical Microbiology, 37(3): 620-627
- Thacker, EL, Thacker, BJ, Kuhn, M, Hawkins, PA, Waters, WR. 2000. Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs. Am J Vet Res.;61(11): 1384-9.
- Thacker, BJ. y Thacker, EL. 2001. Influence of maternally derived antibodies on the efficacy of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin. Am Assoc Swine Vet, p: 513-515.
- Thacker, EL. 2001. Mycoplasma diagnosis and inmunity: Proceddings, American Association of Swine Veterinarians 32<sup>nd</sup> annual: 467 – 469,
- Thacker, EL. 2004. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. J. Swine Health Prod. 12(5): 252-254.
- Thomsen, BL.; Jorsal, SE.; Andersen, S.; Willeberg, P. 1992. The Cox regression model applied to risk factor analysis of infections on the breeding and multiplying herds in the Danish SPF system. Prev. Vet. Med. 12:287-297.
- Torres, P. 1992. Lesiones pulmonares que determinan el decomiso integro de pulmón de porcino. Tesis de Bachillerato Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor de San Marcos. Lima. 39 p.
- Torres, M. 2003. Determinación serológica de la infección con *Mycoplasma hyopneumoniae* en una granja de cerdos de crianza intensiva. Tesis. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor San Marcos. Lima - Perú.
- Tuovinen, VK; Gröhn, YT; Straw, BE. 1994. Health classification of multisource feeder pigs - a field trial. Prev. Vet. Med. 20; 11-22.
- Underdahl, NR; Kennedy, GA; Ramos, AS. 1980. Duration of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in gnotobiotic pigs. Can. Vet. J. 21:258-261.

- Valdivia, AL. 1999. Respuesta a la vacunación contra neumonía enzoótica porcina en términos de producción en la explotación intensiva de cerdos. Tesis. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor San Marcos. Lima - Perú.
- Valdivia, AL. y Calle, E. S. 1999. Respuesta a la vacunación contra neumonía enzoótica porcina en términos de producción en explotación intensiva de cerdos. Rev. Inv. Vet. Perú, 10(2): 71-73.
- Verdin, E; Blanchard, B; Kobisch, M; Bové, JM; Saillard, C. 1996. Use of nested PCR diagnosis test to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* under field conditions. IOM Lett. 4:101-102.
- Wallgren, P; Artursson, K; Fossum, C; Alm, GV. 1993. Incidence of infections in pigs bred for slaughter revealed by elevated serum levels of interferon and development of antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae*. J Vet Med B; 40: 1-12.
- Wallgren, P.; Schwan, O.; Mattsson, S.; Bölske, G. 1996. Comparison of the sensitivity of two ELISA systems for detection of antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae* in naturally infected pigs. Proc. 14<sup>th</sup> IPVS Congress, Bologna, 217.
- Wallgren, P.; Bölske, G.; Gustafsson, S.; Mattsson, S.; Fossum, C. 1998. Humoral immune response to *Mycoplasma hyopneumoniae* in sows and offspring following an outbreak of mycoplasmosis. Vet. Microb 60:193-205.
- Wise, KS; Kim, MF; Theiss, PM; Lo, SC. 1993. A family of strain-variant surface lipoproteins of *Mycoplasma fermentans*. Infect. Immun. 61: 3327–3333.
- Wolfgang, K; Willett, H; Bernard, A; Wilfert, C. 1997. Microbiología. 20<sup>a</sup> ed. Médica Panamericana – Buenos Aires, Argentina. Págs: 987-996.
- Yagihashi, T.; Nunoya, T.; Mitui, T.; Tajima, M. 1984. Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection on the development of *Haemophilus pleuroneumoniae* pneumonia in pigs. Jpn. J. Vet. Sci., 46: 705-713.
- Yagihashi, T; Kazama, S; Tajima, M. 1993. Seroepidemiology of mycoplasmal pneumonia of swine in Japan as surveyed by an enzyme-linked immunosorbent assay. Vet. Microbiol; 34: 155- 166.
- Yeske, P. 2001. Experiences with Mycoplasma vaccinations: What to do if vaccination doesn't live up to expectations. Proceedings of the Allen D Leman Swine Conference. Minnesota-USA. p: 108 – 110.

- Yogev, D; Menaker, D; Strutzberg, K; Levisohn, S; Kirchhoff, H; Hinz, K; Rosengarten, R. 1994. A surface epitope undergoing high-frequency phase variation is shared by *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma bovis*. *Infect. Immun.* 62: 4962–4968.
- Young, TF.; Ross, RF.; Drisko, J. 1983. Prevalence of antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae* in Iowa swine. *Am J Vet Res.* 44(10):1946-8.
- Zhang, Q; Xu, W; Li, J; Ding, Q; Wang, G. 1990. Attenuated pathogenicity of the lapinized strain of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs. *J. Chin. Electron Microsc. Soc.* 9(1):5-9.
- Zhang, G, Young, T.F; Ross, RF. 1994. Glycolipid Receptors for Attachment of *Mycoplasma hyopneumoniae* to Porcine Respiratory Ciliated Cells. *Infect Immun;* 62(10): 4367-4373
- Zhang, Q; Young, TF; Ross, RF. 1995. Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesion. *Infect Immun;* 63: 1013 – 1019.
- Zielinski, GC; Young, TF; Ross, RF. 1990. Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to cell monolayers. *Am. J. Vet. Res.* 51:339-343.
- Zielinski, GC; Ross, RF. 1993. Adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine ciliated respiratory tract cells. *Am. J. Vet. Res.* 54:1262-1269.
- Zimmermann, W; Odermatt, W; Tschudi, P. 1989. Enzootic pneumonia: partial sanitation in EP-reinfected pig herds as an alternative method to total sanitation. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 131; 179 – 186.
- Zimmermann, W. 1990. Experience in the EP sanitation programme to eradicate EP. *Tieraertzl. Umschau* 45; 559 – 562.

# ANEXOS

## 1. GANANCIA DE PESO

### Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: GANAPESO

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	423.578 <sup>a</sup>	5	84.716	1.070	.383
Intercept	639466.085	1	639466.085	8078.673	.000
GRUPO	266.728	2	133.364	1.685	.192
SEXO	82.752	1	82.752	1.045	.309
GRUPO * SEXO	74.098	2	37.049	.468	.628
Error	6649.007	84	79.155		
Total	646538.670	90			
Corrected Total	7072.585	89			

a. R Squared = .060 (Adjusted R Squared = .004)

## 2. TITULO DE ANTICUERPOS

### Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
AC21D control	30	2.6717	.58633	.10705	2.4527	2.8906	.00	3.33
vacuna dia 36 y 56	30	2.5993	.65767	.12007	2.3538	2.8449	.00	3.14
vacuna 42 y 56	30	1.9603	1.20209	.21947	1.5115	2.4092	.00	3.29
Total	90	2.4104	.90947	.09587	2.2200	2.6009	.00	3.33
AC36D control	30	2.4253	.40872	.07462	2.2727	2.5780	1.36	2.91
vacuna dia 36 y 56	30	2.5327	.59271	.10821	2.3113	2.7540	.00	2.92
vacuna 42 y 56	30	1.8110	.71346	.13026	1.5446	2.0774	.00	2.80
Total	90	2.2563	.66105	.06968	2.1179	2.3948	.00	2.92
AC71D control	30	1.6353	.64439	.11765	1.3947	1.8760	.00	2.95
vacuna dia 36 y 56	30	3.3420	.28244	.05157	3.2365	3.4475	2.51	3.72
vacuna 42 y 56	30	3.1520	.36726	.06705	3.0149	3.2891	1.56	3.51
Total	90	2.7098	.89165	.09399	2.5230	2.8965	.00	3.72
AC91 control	30	2.1490	.66164	.12080	1.9019	2.3961	.64	3.51
vacuna dia 36 y 56	30	3.2643	.26912	.04913	3.1638	3.3648	2.30	3.61
vacuna 42 y 56	30	3.1480	.29695	.05422	3.0371	3.2589	2.49	3.64
Total	90	2.8538	.66963	.07059	2.7135	2.9940	.64	3.64
AC112 control	30	2.3223	1.02351	.18687	1.9401	2.7045	.00	3.60
vacuna dia 36 y 56	30	3.1343	.31643	.05777	3.0162	3.2525	2.18	3.66
vacuna 42 y 56	30	3.2930	.24065	.04394	3.2031	3.3829	2.70	3.66
Total	90	2.9166	.75869	.07997	2.7577	3.0755	.00	3.66
AC145 control	30	3.1567	.24814	.04530	3.0640	3.2493	2.71	3.65
vacuna dia 36 y 56	30	3.4423	.22919	.04184	3.3568	3.5279	2.55	3.69
vacuna 42 y 56	30	3.4520	.18148	.03313	3.3842	3.5198	3.00	3.74
Total	90	3.3503	.25863	.02726	3.2962	3.4045	2.55	3.74

### ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
AC21D Between Groups	9.195	2	4.598	6.209	.003
Within Groups	64.419	87	.740		
Total	73.614	89			
AC36D Between Groups	9.097	2	4.549	13.282	.000
Within Groups	29.794	87	.342		
Total	38.892	89			
AC71D Between Groups	52.491	2	26.245	124.999	.000
Within Groups	18.267	87	.210		
Total	70.758	89			
AC91 Between Groups	22.555	2	11.278	56.541	.000
Within Groups	17.353	87	.199		
Total	39.908	89			
AC112 Between Groups	16.267	2	8.134	20.239	.000
Within Groups	34.963	87	.402		
Total	51.230	89			
AC145 Between Groups	1.689	2	.845	17.232	.000
Within Groups	4.264	87	.049		
Total	5.953	89			

### 3. INCIDENCIA DE DIARREAS

#### Casos de diarreas durante el estudio

GRUPOS	N° animales	N° casos de diarreas	Morbilidad (%)	Mortalidad (%)
Control	30	8	26.6	0
Tratamiento 1	30	12	40.0	0
Tratamiento 2	30	11	36.6	0

#### Resultados de la prueba de chi cuadrado para la evaluacion de diarreas

	Diarreas	No diarreas	Total
Tto 1	12	18	30
Tto 2	11	19	30
Control	8	22	30
Total	31	59	90

	Diarreas	No diarreas	Total
Tto 1	10.33	19.67	30
Tto 2	10.33	19.67	30
Control	10.33	19.67	30
Total	31	59	90

0.27	0.14
0.04	0.02
0.53	0.28

Chi obtenido	<b>1.279</b>
Chi tabla	5.991
GL = 2	

CONCLUSION: No existe diferencia estadística significativa.

#### 4. EVALUACION PULMONAR EN CAMAL

##### TRATAMIENTO 1

###### Area de consolidacion (%) / lóbulo pulmonar

	AD	CD	DD	AI	CI	DI	I	Area Total	Categoria
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0.7	0	0	0.7	1
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	1.4	0	2.3	2.3	0	0.6	6.6	1
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	1.4	0	2.3	0	0	0	3.7	1
10	0	1.4	0	0	0	0	0	1.4	1
11	0	0	0	0	2.3	0	0.6	2.9	1
12	0	0	0	0	0	0	1.9	1.9	1
13	0	1.4	0	0	0.7	0	0	2.1	1
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	1.4	1.4	0	0.7	0.7	0	0	4.2	1
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	1.4	0	0	0.7	2.3	0	0	4.4	1
22	1.4	0	0	0	0	0	0	1.4	1
23	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	0	4.1	0	0	0	0	0	4.1	1
26	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0.7	0	0	0.7	1

###### Categorias de consolidación pulmonar

	0	1	2	3	4	5	6	TOTAL
N° animales	18	12	0	0	0	0	0	30
Indice total	0	12	0	0	0	0	0	12

###### INDICE DE NEUMONIA

IDN =	$\frac{\text{Indice Total}}{\text{N° animales examinados}}$	$\frac{12}{30}$	<b>0.40</b>
-------	---	-----------------	-------------

## TRATAMIENTO 2

### Area de consolidacion (%) / lóbulo pulmonar

	AD	CD	DD	AI	CI	DI	I	Area Total	Categoría
1	0	0	0	0.7	0	0	0	0.7	1
2	0	1.4	0	0.7	0	0	0	2.1	1
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	1.4	0	0	0	0	0	1.4	1
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	4.1	4.1	0	2.3	3.8	0	0.6	14.9	2
8	0	1.4	0	0	0	0	0	1.4	1
9	0	0	0	0.7	0	0	0	0.7	1
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	1.4	0	0.7	0.7	0	0	2.8	1
12	6.9	1.4	0	2.3	2.3	0	0	12.9	2
13	0	0	0	0	0.7	0	0	0.7	1
14	0	1.4	0	0	0	0	0	1.4	1
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	4.1	0	0	3.8	3.8	0	0	11.7	2
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	1.4	4.6	0	0	0.7	0	0	6.7	1
24	0	0	0	2.3	0.7	0	0	3	1
25	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27	0	0	0	0	0.7	0	0	0.7	1
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	0	4.1	0	0	2.3	0	0	6.4	1
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0

### Categorías de consolidación pulmonar

	0	1	2	3	4	5	6	TOTAL
N° animales	16	12	2	0	0	0	0	30
Indice total	0	12	4	0	0	0	0	16

### INDICE DE NEUMONIA

IDN =	Indice Total	16	30	0.53
	N° animales examinados	30		

## CONTROL

### Area de consolidacion (%) / lóbulo pulmonar

	AD	CD	DD	AI	CI	DI	I	Area Total	Categoria
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1.4	4.1	0	2.3	4.1	0	0	11.9	2
3	1.4	1.4	0	0	0	0	0	2.8	1
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	4.1	6.9	0	2.3	2.3	0	1.9	17.5	2
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	1.4	0	0.7	0.7	0	0	2.8	1
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	6.9	6.9	0	3.8	3.8	0	3.1	24.5	3
10	1.4	6.9	0	5.3	2.3	0	3.1	19	2
11	9.7	6.9	0	3.8	0	0	0	20.4	2
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	9.7	6.9	0	0	3.8	0	0	20.4	2
16	9.7	9.7	12.7	3.8	3.8	10.1	3.1	52.9	6
17	1.4	0	0	0	0	0	0	1.4	1
18	1.4	1.4	4.3	0.7	2.3	0	0	10.1	1
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	6.9	1.4	0	0	0	0	4.4	12.7	2
21	0	9.7	0	0	2.3	0	0.6	12.6	2
22	6.9	9.7	0	2.3	0	0	0	18.9	2
23	0	6.9	0	0	2.3	0	0	9.2	1
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	1.4	6.9	0	2.3	0	0	0	10.6	1
27	1.4	1.4	0	2.3	0	0	0	5.1	1
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0	3.8	5.3	0	0	9.1	1
30	6.9	6.9	12.7	0.7	3.8	10.1	3.1	44.2	5

### Categorias de consolidación pulmonar

	0	1	2	3	4	5	6	TOTAL
N° animales	11	8	8	1	0	1	1	30
Indice total	0	8	16	3	0	5	6	38

### INDICE DE NEUMONIA

IDN =	$\frac{\text{Indice Total}}{\text{N° animales examinados}}$	$\frac{38}{30}$	1.27
-------	---	-----------------	------