

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS Fundada en 1551

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P DE MEDICINA VETERINARIA

Determinación serológica de la infección con *Mycoplasma hyopneumoniae* en una granja de cerdos de crianza intensiva

TESIS para optar el Título Profesional de: MÉDICO VETERINARIO

AUTOR

MARLON OBED TORRES ARRESCURRENAGA

LIMA – PERÚ 2003

Esta tesis se la dedico:

A Dios, y al Niño Jesús de Tupín, por la devoción que le tengo y por esa fuerza que me da en los momentos mas importantes de mi vida.

A mis padres, Juliana y Pepe, a mi hermana Liseth, por ser pilar de mis sueños y metas, porque en cada cosa que hago, ellos están en mi mente y en cada logro que obtengo los llevo en mi corazón.

A la Dra. Sonia Calle, no solo por ser la promotora de esta tesis, sino por ser guía, consejera y por la confianza que ha depositado en mi, que espero nunca defraudar.

A mis maestros, el Dr. Pedro Mayorga, Dr. Cesar Gavidia, Dr. Alfredo Delgado, Dr. Javier Alejo y al Dr. Carlos Camacho, cuyo ejemplo de vida profesional me ha servido de modelo ha seguir.

A Jessica, por su cariño y apoyo.

A mis amigos, Jorge, Yvan, Hernán, Beto y Wally por haberme escuchado y apoyado en los momentos cuando son necesarios los verdaderos amigos.

*A la promo Máximo Gamarra Rojas, a
Daniel, David, Mariluz, Bere, Yeny,
Karim y Katy.*

Un agradecimiento especial

**Al Dr. Luis E. Núñez, Dr. Nestor Falcón,
Dr. Erick Zacarías, Dra. María Cerón, Dra.
Hermelinda Rivera y al Dr. Cesar
Alzamora, quienes con su ayuda
desinteresada hicieron posible la realización
de esta tesis.**

A la Empresa San Fernando S.A.,
por su apoyo al desarrollo de la
investigación, haciendo un gran aporte
a la Porcicultura peruana.

Tabla de Contenido

	<i>Página</i>
I. Introducción	1
II. Revisión bibliográfica	
2.1 Antecedentes	3
2.2 Etiología	4
2.3 Epidemiología	
2.3.1 Agente	5
2.3.2 Fuentes de infección	5
2.3.3 Transmisión	6
2.3.4 Hospedero	7
2.3.5 Factores ambientales	7
2.3.6 Enfermedad	8
2.3.7 Complejo de la Enfermedad Respiratoria Porcina	9

2.4	Inmunidad	9
2.4.1	Inmunidad humoral	10
2.4.2	Inmunidad celular	13
2.5	Patogénesis	14
2.6	Diagnóstico	15
2.6.1	Pruebas de laboratorio que detectan el antígeno	15
2.6.1.1	Anticuerpos fluorescentes	15
2.6.1.2	Inmunohistoquímica	16
2.6.1.3	Reacción en cadena de la Polimerasa	16
2.6.2	Pruebas Serológicas	18
2.6.2.1	Fijación del complemento	18
2.6.2.2	Inmuno Ensayo Ligado a Enzimas	19
2.6.2.2.1	ELISA indirecto	19
2.6.2.2.2	ELISA de Bloqueo	20
2.7	Control y Prevención	21
2.7.1	Control por erradicación	21
2.7.2	Control por medidas de Manejo y Bioseguridad	22
2.7.3	Vacunación	22
III.	Materiales y Métodos	
3.1	Lugar del estudio	24
3.2	Sistema de manejo de los porcinos en la granja	24
3.3	Animales y Tamaño de la muestra	25
3.4	Materiales usados durante el muestreo	26

3.5	Materiales y equipos usados en el laboratorio	26	
3.6	Análisis estadístico	26	
3.7	Método de colección de las muestras		27
3.8	Método de detección de anticuerpos		
3.8.1	Preparación de reactivos	27	
3.8.2	Dilución, distribución e incubación de muestras y controles	28	
3.8.3	Lavado de la placa	28	
3.8.4	Dilución, distribución e incubación del conjugado		28
3.8.5	Adición del cromógeno	28	
3.8.6	Lectura e interpretación de los resultados		29
IV.	Resultados	30	
V.	Discusión	35	
VI.	Conclusiones	41	
VII.	Bibliografía citada	42	
VIII.	Apéndice	49	

Resumen

Se realizó un estudio serológico para determinar el momento de mayor infección con Mycoplasma hyopneumoniae en porcinos de crianza intensiva de la provincia de Lima, en el periodo abril - agosto del 2002. Se realizó un muestreo quincenal en 30 animales, desde el nacimiento hasta las 16 semanas de edad. Se utilizó la prueba comercial de ELISA CHEKIT®-Hyoptest-II, para la detección de anticuerpos. El 66.7% (20/30) de los animales presentaron anticuerpos contra M.hyoepneumoniae, de los cuales el 55 % (11/20), seroconvirtió a las 12 semanas, en tanto que el 5 % (1/20), 30 % (6/20), 10 % (2/20), seroconvirtieron a las 10, 14 y 16 semanas de edad, respectivamente. Se concluye que existió un periodo crítico entre las 9 y las 10 semanas de edad, en el cual M. hyopneumoniae inició la infección, que condujo a la seroconversión. Se demostró también, que no existe efecto del sexo y número de partos de la madre de los porcinos en el momento de infección.

Palabras clave: Porcinos, Mycoplasma hyopneumoniae, anticuerpos, ELISA

Abstract

A serological study was conducted to identify the age of highest infection with Mycoplasma hyopneumoniae, in swine under intensive rearing system in the Lima province, during the period April – august, 2002. Blood samples were collected fortnightly from 30 piglets from birth till 16 months of age. The commercial test ELISA CHEKIT®-Hyoptest-II, was used for the detection of antibodies. The 66.7 % (20/30) of the animals showed antibodies against M. hyopneumoniae, where 55 % (11/20) seroconverted at 12 weeks of age whereas 5 % (1/20), 30 % (6/20) and 10 % (2/20) seroconverted at 10, 14 and 16 weeks of age, respectively. It is concluded that exist a critical period between 9 and 10 weeks of age, in which M.hyopneumoniae, began the infection, conducting to the seroconversion. Was demonstrated too, that don't exist effect in the infection time from sex and number of partitions of the swine's dam.

Key word: Swine, *Mycoplasma hyopneumoniae*, antibodies, ELISA.

Lista de Cuadros y Gráficos

- Cuadro 1. Número y porcentaje de porcinos seropositivos y seronegativos a *Mycoplasma hyopneumoniae*, de acuerdo al número de partos de la madre de la que proceden
- Gráfico 1. Porcentaje de porcinos seropositivos a *Mycoplasma hyopneumoniae* de acuerdo a la edad.
- Gráfico 2. Comportamiento de los porcinos que se mantienen libres de la infección con *Mycoplasma hyopneumoniae*
Prueba de Kaplan Meier.
- Gráfico 3. *Porcentaje de porcinos seropositivos a Mycoplasma hyopneumoniae, de acuerdo al sexo y edad.*
- Gráfico 4. Comportamiento de los porcinos machos y hembras que se mantienen libres de la infección con *Mycoplasma hyopneumoniae*.
Prueba de Kaplan Meier.
- Gráfico 5. *Comportamiento de los porcinos que se mantienen libres de la infección con Mycoplasma hyopneumoniae, de acuerdo al número de partos de la madre de la que proceden.*
Prueba de Kaplan Meier.

I. Introducción

La estructura de la producción porcina ha cambiado sustancialmente en los últimos años. Los porcinos se alojan en grandes grupos bajo condiciones intensivas y a menudo en regiones con una población sumamente densa. La alta densidad en un ambiente cerrado facilita la transmisión de agentes patógenos llevados por el aire, dentro de la granja y también entre granjas. Por consiguiente, los trastornos respiratorios son considerados actualmente uno de los problemas más serios en la producción porcina moderna (Christensen *et al*, 2000).

Entre los múltiples agentes infecciosos que producen problemas respiratorios en porcinos, el *Mycoplasma hyopneumoniae*, es reconocido como uno de los más importantes. Es el agente causal de la Neumonía Enzoótica y es considerado un microorganismo de alta prevalencia y de distribución mundial (Ross, 1986). Causa signos clínicos y pérdidas económicas en grado variable, resultado de una compleja interacción con bacterias secundarias, pobre manejo y condiciones medio ambientales adversas (Camacho, 2000).

En los últimos años, *M. hyopneumoniae* ha tomado mayor importancia por ser el patógeno primario más importante del Complejo de Enfermedad Respiratoria Porcina (Halbur, 1997), además se ha demostrado que potencia la neumonía causada por el virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino (SRRP) (Thacker E, 1999c) y posiblemente interactúa con el Circovirus Tipo 2 en la Neumonía Intersticial (Ohlinger, 2002).

La variación en la epidemiología del *M. hyopneumoniae* no se debe a la aparición de nuevos agentes infecciosos, sino al cambio del sistema de producción y a la inestabilidad de sub poblaciones existentes dentro del ganado reproductor (Aldaz, 2002). Todo esto, conlleva a que la velocidad con la que el agente se disemina sea más lenta, lo que resulta en presentaciones clínicas retrazadas (Pijoan, 2000).

La serología, nos permite determinar la infección dentro de una población, con la demostración de la seroconversión o elevación de los títulos de anticuerpos, siendo la forma más segura de diagnosticar la infección en animales vivos. Además, mediante un muestreo seriado de los porcinos desde el nacimiento, es posible evaluar la dinámica de los anticuerpos maternos (Stevenson, 1999), al igual que determinar cuando ocurre la infección (Halbur, 1997; Young *et al*, 2001). Así mismo, es posible evaluar la eficacia tanto de los sistemas de manejo (Clark, 1999), como de las estrategias de vacunación utilizadas (Moore *et al*, 1997).

En el Perú, se ha demostrado la presencia del *M. hyopneumoniae* en gorrinos a la edad de beneficio (Huallanca, 1999). Sin embargo, no se han elaborado programas para su control, basados en el monitoreo serológico, utilizándose esquemas de control resultado de estudios realizados en otros países. Por esto, es necesario determinar la cinética de la infección de este agente, para poder elaborar estrategias de control acordes con la realidad de los sistemas de producción porcina del país.

El objetivo del presente trabajo, fue determinar mediante serología el periodo de infección con *M. hyopneumoniae* en un sistema de producción porcina típico del Perú. Los resultados de este ensayo, además de contribuir a caracterizar la infección en este sistema de producción, pueden ser utilizados para la elaboración de estrategias de prevención y control de la enfermedad apropiadas para la granja, las cuales pueden incluir: diseño de programas de vacunación, utilización de antibióticos en el alimento en determinados periodos, y cambios en el manejo y la bioseguridad de la granja.

I. Revisión Bibliográfica

1.1 Antecedentes

La neumonía causada por micoplasma es una enfermedad conocida desde hace más de cien años (Goodwin, 1982). Era considerada como una Pasteurellosis, pero en 1907, Hutyra excluye a este agente como el causante y le atribuye un protagonismo secundario (Stipkovits, 1995). Ya que el agente era filtrable, se creía que la Neumonía Enzootica era una enfermedad vírica. Una caracterización definitiva de una neumonía crónica diferente a la Influenza Porcina, surgió con el trabajo de Pullar en 1948 y de Guljarani y Beveridge en 1951 (Ross, 1986). Young (1967) menciona que hasta entonces los sinónimos más comunes de la enfermedad eran: Neumonía Infecciosa del Cerdo (Pullar, 1948; Guljarani y Beveridge, 1951); Neumonía Virógena Enzootica (Hjärre y col, 1952), Tos infecciosa del cerdo (Rislakki, 1953), Neumonía Enzootica del cerdo (Wesslén y Lannek, 1954), Fergelgrippe (Köbe, 1933) y Neumonía Virógena Porcina (Betts, 1952).

En 1965, simultáneamente se aisló el agente etiológico, en Inglaterra Goodwin *et al* lo llamaron *Mycoplasma suis pneumoniae* y en Estados Unidos Maré y Switzer lo llamaron *Mycoplasma hyopneumoniae*, prevaleciendo este nombre sobre el otro por tener prioridad (Ross, 1986). Actualmente, el *M. hyopneumoniae* ha sido reportado en muchos países y es una de las enfermedades más comunes y económicamente importantes en los porcinos.

1.2 Etiología

Los micoplasmas son esencialmente bacterias pequeñas, simples, extracelulares, se reproducen por fisión binaria como otras bacterias y no han sido identificados organelas específicos (Janke, 1997). Taxonómicamente pertenecen a la Clase Mollicutes, Orden Mycoplasmatales y Familia Mycoplasmataceae.

M. hyopneumoniae es pleomórfico, Gram negativo, usualmente inmóvil y anaerobio facultativo, carece de pared celular y posee una membrana plasmática trilaminar compuesta de lípidos y proteínas (Nicolet, 1986).

Su aislamiento es complicado, por lo exigente de sus requisitos de crecimiento y la presencia frecuente de *Mycoplasma hyorinis* (Ross, 1986). Se emplea el medio de Friis, modificado por la adición de 8,1 % de suero porcino para mejor adaptación del micoplasma al cultivo (Thacker, 2001). Crece lentamente después de 3 a 30 días de incubación. Los cultivos se pasan varias veces en caldo, se inoculan en medios sólidos y se incuban en una atmósfera de 5 a 10 % de dióxido de carbono. Las colonias se hacen visibles después de 2 a 3 días de incubación y aumentan de tamaño hasta aproximadamente 0.25 a 1 mm de diámetro a los 10 días. Además, requiere para su crecimiento esteroides y fermenta la glucosa, pero no hidroliza arginina o urea. Es necesario resaltar que el *Mycoplasma flocculare*, es un no patógeno comúnmente encontrado en pulmones de porcinos y tiene muchas similitudes morfológicas, de crecimiento y antigénicas con *M. hyopneumoniae* (Ross, 1986).

Un atributo importante de los micoplasmas, con potenciales implicaciones patogénicas y para el control, es su marcada propensión para cambiar los antígenos de superficie (Ross, 2000). Recientemente, se han identificado algunas de sus proteínas, la P97 es una adhesina que facilita el ataque, colonización e infectividad; la P65 es la mayor lipoproteína de superficie (Janke, 1997); y la P72, que está involucrada en el sistema de la enzima fosfotransferasa de la bacteria (Chung *et al*, 2000). El *M. hyopneumoniae* tiene uno de los más pequeños genomas lo que hace difícil su manipulación genética (Thacker E, 1999d).

Según Thacker (1999e), el *M. hyopneumoniae* no es clasificado por cepas y carece de marcadores para diferenciarlos. Sin embargo, Desroisiers (2001) mediante pruebas de inhibición, ha probado que existe variación genética y antigénica entre cepas. Además, mediante PCR se ha demostrado que *M. hyopneumoniae* es genéticamente diverso y puede ser dividido hasta en seis subgrupos epidemiológicos, aunque el significado de estas variaciones genéticas no es conocido (Halbur, 1997).

2.3 Epidemiología

2.3.1 Agente

Mycoplasma hyopneumoniae es un organismo ubicuo, presente tempranamente en la población porcina (Halbur, 1997). Reside entre los cilios de los pasajes nasales, tráquea, bronquio y bronquiólos, sobre la punta de las micro vellosidades de la superficie de las células epiteliales que tapizan estas vías aéreas. Permanecen sin ser eliminados por los movimientos mucociliares y sin estimular una respuesta inmune que pueda apoyar su remoción (Janke, 1997).

Tolera temperaturas de 45° C por 30 minutos, soporta la liofilización y temperaturas de -180° C. Desaparece del pelo y ropa en 48 horas en ambiente seco, pero puede sobrevivir durante mucho tiempo en medio líquido idóneo (Andrada *et al*, 2002).

Los micoplasmas son extremadamente adeptos a sobrevivir en sus hospederos (Thacker, 2001), sin embargo se han recuperado inóculos de bebederos y del agua de lluvia a los 31 y 17 días después respectivamente, lo que puede explicar la transmisión por aerosol del organismo durante periodos de humedad relativa alta (Amass, 1999).

2.3.2 Fuentes de Infección

Las observaciones de campo, han implicado al cerdo portador como la fuente principal de la infección con *M. hyopneumoniae* (Ross, 1986). Pullar (1948) resumió los datos acerca de los brotes de neumonía en 190 piaras de porcinos australianos, el 80% de los brotes, estaban asociados a la introducción y mezcla de porcinos de

comercio (alimentadores) con porcinos ya presentes en la granja, y el 20 % estaba asociado con la introducción de reproductores (Ross, 1986).

M. hyopneumoniae es portado subclínicamente en el tracto respiratorio de chanchillas y marranas, las cuales sirven como fuente de infección para los lechones en las maternidades. Los porcinos que escapan a la infección temprana, se pueden infectar cuando entran en contacto con porcinos infectados durante las fases de crecimiento o finalización (Janke, 1997).

2.3.3 Transmisión

La transmisión del *M. hyopneumoniae* entre porcinos ocurre por el contacto con secreciones respiratorias, por el contacto nariz con nariz, o por la exposición con el organismo llevado en las secreciones aerolizadas por la tos (Janke, 1997).

Debido a la naturaleza exigente del microorganismo y el gran tamaño del inóculo requerido para la transmisión experimental de la enfermedad, se cree que no puede transmitirse fácilmente entre piaras a menos que existan porcinos portadores, sin embargo, han ocurrido brotes entre piaras aisladas. En Gran Bretaña, se encontró que los brotes ocurrían con mayor frecuencia en piaras separadas por menos de 3.2 Km, lo que demostraría la transmisión aérea, favorecida por condiciones ambientales de alta humedad relativa (Ross, 2000).

En sistemas de producción continua, el *M. hyopneumoniae* y otros importantes patógenos respiratorios, se pueden transmitir de los porcinos más viejos a los más jóvenes (Ross, 1986).

En sistemas “Todo dentro todo fuera”, se demostró que el *M. hyopneumoniae* se transmite de las madres a sus lechones en periodos de lactación de 28 días, mientras que en sistemas de Destete Segregado Temprano (DST), se evitó la transmisión cuando los lechones se destetaron antes de 15 días de edad. En general, la edad actual necesaria

para prevenir la transmisión de *M. hyopneumoniae* de marranas a lechones varía de granja a granja (Clark, 1997).

2.3.4 Hospedero

Los porcinos de todas las edades son igualmente susceptibles al microorganismo (Ross, 1986), pero la tasa de morbilidad es más alta durante la etapa de crecimiento, llegando a ser del 100 % cuando la infección llega por primera vez a una granja. La mortalidad es baja, y se eleva cuando existe una infección secundaria o cuando la enfermedad llega por primera vez, pudiendo ocurrir inclusive en animales adultos (Blood, 1986).

Por lo común, no se observan signos de la enfermedad hasta que los lechones tienen 6 semanas de edad (Ross, 1986), y la enfermedad es más severa cuando los lechones son desafiados a las ocho semanas de edad (Thacker E, 1999b).

En cuanto al sexo, existe mayor prevalencia de neumonía y pleuritis en machos castrados comparado con hembras (debida al estrés y cambios hormonales). En cuanto a la raza, existe una mayor resistencia a enfermedades respiratorias en los Hampshire en relación con los Yorkshire y los Landrace (Christensen *et al*, 2000).

2.3.5 Factores ambientales

La variación en las instalaciones de confinamiento de ventilación natural, crea situaciones en favor del organismo dentro del tracto respiratorio, por la disminución de los mecanismos de defensa. (Thacker E, 1999b).

La contaminación aérea mínima encontrada en una instalación aislada, es suficiente para inducir cambios celulares en el fluido Bronqueo Alveolar (BAL), y un agente infeccioso como el virus del PRRS y/o *M. hyopneumoniae*, puede alterar más la composición celular y la función del macrófago alveolar (Backstrom *et al*, 1999).

La temperatura y la humedad, modifican la penetración en los pulmones de patógenos primarios y secundarios, al alterar el tamaño de partículas de aerosol infectadas y el mecanismo protector de las vías respiratorias. Así, se altera la sedimentación y la concentración de partículas infectadas que van por el aire (Blood, 1986). En Dinamarca, los brotes fueron mas frecuentes durante el otoño e invierno, y en granjas con mas de 500 porcinos (Ross, 2000). Además, el microorganismo ha podido detectarse por PCR en el aire de galpones infectados (Desroisiers, 2001).

2.3.6 Enfermedad

La enfermedad ocurre cuando los porcinos son expuestos a un suficiente número de microorganismos o factores estresantes que permiten la proliferación del organismo previamente existente (Janke, 1997).

La Neumonía Enzoótica es más frecuente en la crianza intensiva (Blood, 1986) y en su forma clásica, es observada en granjas tradicionales de un solo sitio (Pijoan, 2000), aunque se ha demostrado su presencia en la crianza artesanal (Ibarra, 2000).

Después de 2 a 3 semanas que el *M. hyopneumoniae* ha colonizado el pulmón, los porcinos comienzan a toser por 3 a 4 semanas, tomándoles entre 70 a 80 días para eliminar la infección. La tos, es el signo predominante de esta infección y en una población de 500 a 1000 porcinos de un mismo galpón, todos no se infectan el mismo día, por esto pereciera que los animales tosen durante todo el periodo (Clark, 1997).

Encuestas realizadas por Whittlestone (1979) y Switzer y Ross (1975), indican que las lesiones típicas de la neumonía por micoplasma se encuentran en el 30 a 80% de los porcinos al momento del beneficio (Ross, 1986). En Estados Unidos, mediante serología Young *et al* (1983), encontraron una prevalencia del 60 %; Owen (1990) encontró 32 % de animales seropositivos, y Erlandson (2002) reportó que el 47.4% de las madres, y el 54.4 % de los gorrinos tenían anticuerpos contra *M. hyopneumoniae*. En Perú, un estudio realizado por Huallanca (1999) determinó un 12.16 % de reactores positivos a *M. hyopneumoniae* en porcinos en edad de beneficio.

2.3.7 Complejo de Enfermedad Respiratoria Porcina (CERP)

Es una presentación nueva de la enfermedad, observada en granjas de alto estado sanitario y de producción en sitios separados, que practican el DST. Algunos grupos de porcinos presentan tos y retraso en el crecimiento al final del engorde, alrededor de las 16 y 18 semanas de edad (Pijoan, 2000).

M. hyopneumoniae es un patógeno primario de este complejo, jugando el mayor de los roles e interactuando con otros patógenos primarios como el Virus del PRRS, Influenza, *Actinobacillus pleuroneumoniae*, etc. (Halbur, 1997).

El cambio en la epidemiología del *M. hyopneumoniae*, no se ha dado por la aparición de estos agentes infecciosos sino por el cambio en el sistema de producción; la separación de los lechones de sus madres a temprana edad, interfiere con el proceso normal de infección - colonización que se lleva a cabo en granjas tradicionales, en las cuales los lechones se infectan rápidamente de sus madres porque el periodo de lactancia es más largo. Cuando los lechones destetados tempranamente son llevados a otra granja (destete aislado) lejos del área de maternidad, la única fuente del agente son los animales que llegaron infectados, así la velocidad con la que el agente se disemina es mas lenta, lo que resulta en presentaciones clínicas retrasadas (Pijoan, 2000)

En este complejo el 70 % de los porcinos son afectados y aproximadamente entre un 4 a 6 % muere (Clark, 1999). En Estados Unidos, afecta anualmente a 10 millones de animales, produciendo perdidas económicas de aproximadamente 40 millones de dólares (Thacker *et al*, 1999).

2.4 Inmunidad

Los micoplasmas emplean muchos métodos para evadir los mecanismos de defensa del hospedero, ya sea el natural sistema innato, o la inmunidad inducida por la vacunación (Thacker E, 1997).

Las vellosidades en la capa externa y la cápsula en la superficie del organismo, son importantes en la protección del *M. hyopneumoniae* de varias células del sistema inmune como neutrófilos y macrófagos. Puede evadir el reconocimiento por el sistema inmune de memoria, debido a la presencia o conformación de las proteínas de superficie o lipoproteínas, muchas de estas, producidas para incrementar la habilidad de adherencia a las células hospederas, aumentando la infectividad.

M. hyopneumoniae usa además, otros mecanismos para evitar su destrucción por el sistema inmune que incluyen: 1. Previendo que los linfocitos respondan a sustancias que normalmente las activan (inmunosupresión), 2. Sobre activación de varias células blanco del sistema inmune, incluyendo linfocitos y macrófagos, y 3. Causando la liberación de varias sustancias (citoquinas) las cuales adicionalmente activan las células, así previenen el desarrollo de mecanismos específicos de eliminación. Todo esto, permite al *M. hyopneumoniae* sobrevivir en el pulmón de los porcinos por largos periodos sin ser eliminados (Thacker E, 1997).

2.4.1 Inmunidad humoral

Las bacterias extracelulares como *M. hyopneumoniae*, usualmente despiertan la respuesta inmune humoral localizada como una de las principales respuestas inmunes protectivas.

Los polisacáridos en la superficie celular, estimulan los linfocitos B, dando un aumento a una fuerte respuesta inicial de la Inmunoglobulina M, siguiendo con Ig G y la producción de Ig A. Debido a que el *M. hyopneumoniae* es un patógeno del epitelio respiratorio y es “no invasivo”, la inducción de Ig A en secreciones, juega un rol clave en la defensa contra la infección, colonización y el subsiguiente desarrollo de la enfermedad clínica.

El sistema inmune de mucosa, tiene un rol crítico en el éxito o fracaso de las vacunas contra micoplasma, su importancia ha sido documentada en estudios de vacunas contra neumonía micoplásmica en ratones, los cuales sugieren que mientras los

anticuerpos circulantes parecen estar envueltos en la protección contra la enfermedad, una protección completa o mejorada contra micoplasmas patógenos, puede requerir estimulación de una respuesta inmune mucosa local en el tracto respiratorio (Thacker E, 1997).

Los porcinos vacunados o desafiados con *M. hyopneumoniae*, tienen una alta concentración de Ig A e Ig G específicos de mucosa en el fluido BAL, mientras que en los porcinos no vacunados y desafiados, los niveles de anticuerpos en el Fluido BAL ascienden un mes después del desafío, lo que indica su importancia en la resolución de la neumonía por micoplasma (Thacker E, 1999d).

Mediante la prueba de ELISA, se determinó que las chanchillas de hatos infectados tienen una Densidad Óptica (DO) mas alta que las marranas, probablemente porque ellas han sufrido una infección mas reciente durante el periodo de crecimiento (Clark, 1999). Resultados serológicos de Australia y Estados Unidos, indican que hay una caída progresiva y significativa en la concentración de anticuerpos de las marranas hasta el tercer parto. Sin embargo, algunas marranas a partir del cuarto parto, poseen una doble concentración de anticuerpos que las de tercer parto, quizás porque estas hembras fueron expuestas al *M. hyopneumoniae* al momento en que había bajas concentraciones de anticuerpos, por lo que hubo una respuesta anamnésica del sistema inmune. Aun así, este incremento en los niveles de anticuerpos en marranas de mas de tres partos, indica que estos hatos tienen un inestable estado inmunitario (Clark, 1999).

Altos niveles de anticuerpos pasivos o maternos interfieren con la eficacia de las vacunas, ya que los lechones vacunados a la primera y tercera semana de edad no responden serológicamente a la vacunación, mientras que los vacunados a las 6 semanas responden mejor a la vacunación, aún en presencia de anticuerpos maternos.

Los anticuerpos maternos, previenen el desarrollo de lesiones producidas por *M. hyopneumoniae* mientras el lechón es expuesto al contagio de su madre, y por un corto tiempo después del destete. En un estudio, porcinos de 4 y 6 semanas de edad procedentes de madres vacunadas fueron significativamente protegidos contra la consolidación pulmonar después de una infección experimental (Jayappa *et al*, 2001).

La inmunidad materna inhibe el desarrollo de ambas respuestas local y sistémica, de esta manera demora el desarrollo de la neumonía por micoplasma (Thacker E, 2001), pero tiene un mínimo o ningún impacto en el nivel de infección (Thacker B *et al*, 2001).

Los lechones que son amamantados por marranas o chanchillas que provienen de hatos positivos a micoplasma, generalmente tienen anticuerpos maternos, y bajo circunstancias normales estos anticuerpos decrecen gradualmente en un periodo de seis semanas. Sin embargo, el nivel y duración de los anticuerpos maternos son extremadamente variables entre porcinos y hatos (Thacker, 1997). Clark (1999) encontró un coeficiente de regresión de 0.50 entre los niveles de anticuerpos de marranas vacunadas y sus lechones de tres días de edad, lo que indica una similitud en sus concentraciones de anticuerpos.

Los porcinos infectados desarrollan anticuerpos contra el P97, y anticuerpos específicos contra esta proteína previenen la unión de *M. hyopneumoniae* a los cilios en cultivos. Sin embargo, la vacunación con proteína purificada P97 resulta en una producción específica de anticuerpos, pero falla en la protección contra desafíos experimentales. La P65 también estimula la producción de anticuerpos, pero la capacidad protectora de estos no ha sido bien establecida (Thacker E, 1997).

No se sabe 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 *M. hyopneumoniae* al sistema inmune (Thacker, 2001).

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

2.4.2 Inmunidad celular

Mycoplasma hyopneumoniae dirige la respuesta inmune lejos de la respuesta de los Linfocitos T Helper Tipo 1 (que activan a los macrófagos para fagocitar microorganismos) hacia una respuesta de los Linfocitos TH2 que es menos efectiva en controlar y eliminar el organismo. Esto puede disminuir la respuesta a otros patógenos respiratorios, lo que resulta en el incremento de la neumonía (Thacker, 2001).

Se sabe que los Linfocitos TH1 son estimulados por las vacunas, esto ha sido demostrado por el aumento en las células secretoras de Interferón Gamma en los animales vacunados, mientras que en porcinos no vacunados y desafiados con *M. hyopneumoniae* se encontró una alta concentración de Factor de Necrosis Tumoral α en fluido BAL (Thacker B *et al*, 2000).

M. hyopneumoniae incrementa el nivel de citoquinas pro inflamatorias (macrófagos), las Interleucinas 1 (α y β) y 6, que inducen una inflamación más amplia y daño tisular (Thacker *et al*, 1999a). Aparentemente la producción de citoquinas estaría relacionada con el aumento de calcio producto de la infección de las células epiteliales ciliadas (Thacker, 1999d).

Otros estudios, sugieren que varias proteínas de superficie, especialmente lipoproteínas, juegan un rol en la activación de los macrófagos y linfocitos. Inversamente, el organismo puede suprimir la reactividad del linfocito, pudiendo ligar no específicamente Igs y elaborar proteasas capaces de dividir a la Ig A (Janke, 1997).

Todas estas actividades interfieren con la respuesta inmune, por esto se piensa que los cambios microscópicos, sobre todo la hiperplasia peribronquial y linforreticular perivascular, están asociados con la respuesta inmune desarrollada por el microorganismo. En animales timectomizados, se encontró que las lesiones neumónicas eran menos severas, lo que demuestra la importancia de la inmunidad celular en el desarrollo del *M. hyopneumoniae* (Thacker y Thacker, 1999).

2.5 Patogénesis

La patogenía de la neumonía por micoplasma es compleja y depende no solo del daño causado directamente por el agente, sino también por el daño causado por el sistema inmune del hospedero (Thacker *et al*, 1999).

Los micoplasmas patógenos, utilizan un proceso de virulencia que involucra la unión / colonización, citotoxicidad, competición por el sustrato, y la evasión y modulación de la respuesta inmune del huésped. Estos procesos no se miden por un solo efecto, sino por la expresión de una multitud de productos genéticos como adhesinas, receptores de nutrientes, mitógenos, polímeros de polisacáridos y los intermediarios metabólicos (Ross, 2000).

El periodo de incubación es de alrededor de 10 a 16 días, aunque otros estudios han indicado una variabilidad considerable en la duración. Siendo el comienzo de la enfermedad probablemente dependiente de la intensidad de la infección (Ross, 1986).

Por medio de microcopia electrónica, en las fases tempranas de la infección se encontró gran cantidad de *M. hyopneumoniae* en la mucosa bronquial y traqueal, mientras que se encontraron muy pocos en los bronquiólos y alvéolos. Además, se pudo observar su íntima asociación con los cilios, así como la extensa pérdida de estos (Ross, 1986). Esta lesión puede persistir hasta por 18 semanas, y es causada por las sustancias biológicamente activas (receptores de nutrientes, proteasas, adhesinas y metabolitos intermediarios) liberadas por el *M. hyopneumoniae*, lo que reduce la función del aparato mucociliar (Thacker E, 1997).

En el ataque a los cilios, están involucradas también muchas proteínas de superficie e interacciones hidrofóbicas con los componentes superficiales de la célula hospedera (Janke, 1997). Las proteínas de membrana 97 KDa y 145 KDa, están relacionadas en el proceso de unión a los cilios, y adicionalmente la 28.5 KDa y 57 KDa, compiten por la unión de *M. hyopneumoniae* a los cilios (Ross, 2000).

Los micoplasmas también son capaces de producir peróxido de hidrógeno y otros radicales oxígeno, los cuales afectan a las membranas de las células hospederas (Murray *et al*, 1994).

La parálisis de los mecanismos de limpieza mucociliar, retiene secreciones inflamatorias y restos celulares en las vías aéreas bajas y alvéolos (Janke, 1997), lo que sumado a la ineficacia de la respuesta inmune, proveen un medio ideal para las infecciones secundarias con *P. multocida* y *A. pleuroneumoniae* (Thacker E, 1999d).

2.6 Diagnóstico

El diagnóstico definitivo, comprende la combinación de pruebas de laboratorio, la evaluación clínica de los porcinos, y la demostración de las lesiones macro y microscópicas. Es necesario además, el conocimiento del sistema productivo y los factores que permitan la expresión de la neumonía micoplásmica (Halbur, 1997). En ocasiones puede ser útil traer porcinos de las granjas afectadas para juntarlos con animales sanos (Dudley, 1997).

2.6.1 Pruebas de Laboratorio de aislamiento y detección del Antígeno

Dentro de estas pruebas se encuentran: el aislamiento o cultivo, la prueba de Anticuerpos Fluorescentes y la prueba de Inmunohistoquímica. Con respecto a la primera, está se describió en la sección de Etiología, siendo sus mayores desventajas la dificultad y el tiempo que se demora para obtener los resultados.

2.6.1.1 Anticuerpos Fluorescentes

Esta prueba ha demostrado ser confiable en el diagnóstico de la infección con *M. hyopneumoniae*. Para la prueba el tejido debe ser fresco, las muestras de porcinos en fase aguda de la infección dan mejores resultados, mientras que las lesiones consolidadas craneoventrales de porcinos crónicamente afectados (camal) son de poco

valor. La fluorescencia de la muestra observada a través de un microscopio de fluorescencia, indica la presencia del antígeno (Halbur, 1997).

Entre las desventajas de esta prueba están: que no puede detectar el antígeno en infecciones de menor grado de porcinos crónicamente infectados, puede haber pérdida de antígenos detectables durante el transporte de muestras al laboratorio, las muestras no pueden ser preservadas para una posterior referencia, y es necesario para el examen contar con un microscopio de fluorescencia (Halbur, 1997).

2.6.1.2 Inmunohistoquímica

En esta prueba se utilizan secciones de bloques de tejidos embebidos en parafina y fijados en formalina, que pueden ser de un caso actual o de casos archivados de meses o años pasados. Se usa rutinariamente para el diagnóstico de otros patógenos como el virus del SRRP, Influenza y Coronavirus. Permite observar a los patólogos la presencia del antígeno blanco en las células apropiadas en relación con la típica lesión microscópica. La presencia del antígeno y lesiones consistentes con la enfermedad inducida por el patógeno, permiten un rápido y definitivo diagnóstico en 24 horas (Halbur, 1997). Sin embargo, la reacción cruzada con otros micoplasmas no patógenos es su mayor desventaja (Thacker E, 2001).

2.6.1.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Es una prueba que puede ser usada en animales vivos y muertos, es altamente específica, rápida y automatizada. La detección de *M. hyopneumoniae*, en muestras de animales vivos permite la detección de portadores y diseminadores mas temprano que la serología, además los resultados no se confunden por la vacunación (Halbur, 1997), por lo que puede ser evaluada la dinámica de la infección (Calsamiglia, 1999).

Se han descrito técnicas de PCR que detectan *M. hyopneumoniae* en muestras de tejido pulmonar, lavados bronquiales e hisopados nasales. Sorenson *et al* (1997) usaron esta prueba con hisopados tomados de bronquios de porcinos infectados experimentalmente, y encontraron que después de los 28 días post infección no había

diferencia en la sensibilidad comparada con el cultivo y AF para *M. hyopneumoniae*, a los 57 y 85 días el cultivo fue significativamente más sensible que AF o PCR y no había diferencia en la sensibilidad entre el PCR y AF en esta etapa.

La mejor muestra para esta prueba es el lavado bronquial, ya que la presencia en el tracto respiratorio alto y la cavidad nasal es transitoria, por lo que la practicidad de esta prueba en campo es cuestionable (Thacker E, 2001). Además, no es una prueba cuantitativa que mida la dosis infectiva, por eso no se puede asumir que todos los porcinos positivos logren una dosis infectiva, por lo que no existe una correlación entre los positivos a PCR por hisopado nasal y la seroconversión (Calsamiglia, 1999).

2.6.2 Pruebas Serológicas

La serología del *M. hyopneumoniae*, es muy útil para caracterizar cuando y donde la infección ocurra en un hato y cuando se implementen regímenes de tratamiento y control. La especificidad y sensibilidad de las pruebas serológicas pueden variar entre y dentro de los laboratorios por un número de razones como: el origen de los reactivos, el personal que corre la prueba, recipientes del medio y buffer e instrumentos (Halbur, 1997).

Para el análisis de los resultados son necesarios considerar algunos aspectos:

- Existen porcinos infectados que no desarrollan anticuerpos circulantes detectables por muchas semanas.
- Existen problemas de reacción cruzada con otros micoplasmas porcinos.
- Con estas pruebas se detecta la seroconversión y no el inicio de la infección
- En el caso de los animales vacunados la seroconversión contra *M. hyopneumoniae* varía de 30 a 100 % de acuerdo a la vacuna
- La seroconversión puede variar entre 2 y 8 semanas post infección.

La mejor muestra para determinar si la tos es debida *M. hyopneumoniae* es aquella que se toma dos semanas después de observado este signo clínico (Clark, 2000). Sin embargo, la presencia de anticuerpos séricos no esta correlacionada con la enfermedad clínica o el porcentaje de neumonía (Thacker E, 2001), pero la seroconversión en animales que anteriormente eran seronegativos esta correlacionada con el pico de la severidad de las lesiones pulmonares (Calsamiglia *et al*, 1999).

La forma más segura de diagnóstico de la infección usando serología, es mediante un sangrado seriado de los porcinos, con la demostración de la seroconversión o elevación de los títulos de anticuerpos. El sangrado de corte transversal es usado por la simplicidad y rapidez, pero frecuentemente se obtienen conclusiones menos claras y la interpretación es más difícil (Stevenson, 1999).

En América Latina, los perfiles serológicos para *M. hyopneumoniae* se están usando para el seguimiento clínico del problema, para determinar los niveles de infección en una granja en particular, manejar las estrategias de introducción de los animales de reposición y para el diseño y evaluación de los planes de vacunación (Mogollón, 2001).

2.6.2.1 Fijación del Complemento

En esta prueba, los anticuerpos específicos en la muestra (inactivada con calor para remover la actividad del complemento) reaccionan con el antígeno en un pozo. El complemento es adherido, y luego el complejo antígeno – anticuerpo fija el complemento, que si se consume por la reacción demuestra la positividad de la prueba. La Ig M es más eficiente en fijar el complemento, y títulos altos en esta prueba sugieren la presencia de altos niveles de Ig M y por consiguiente una reciente exposición. Los títulos generalmente aparecen entre la segunda y la cuarta semana post infección y persisten por 13 a 15 semanas después.

La desventaja de esta prueba es la reacción cruzada con *Mycoplasma flocculare* y *M. hyorinis* (Halbur, 1997).

2.6.2.2 INMUNO ENSAYO LIGADO A ENZIMAS (ELISA)

La prueba de ELISA, es la mejor prueba serológica para *M. hyopneumoniae* disponible actualmente (Clark, 1999). Es considerada más sensible que la prueba de Fijación del complemento, aunque tiene reacciones serológicas cruzadas con *M. flocculare* y *M. hyorinis*. Existen dos tipos de ELISA para *M. hyopneumoniae*:

2.6.2.2.1 ELISA Indirecto

Es más utilizada en los Estados Unidos. El suero problema es incubado con antígeno que recubre el fondo de los pocillos, cualquier anticuerpo específico contra *M. hyopneumoniae* se liga al antígeno de los pocillos y forma un complejo antígeno anticuerpo en la superficie del pocillo de la placa. Después de la incubación y el lavado, se adhiere un conjugado marcado con Peroxidasa, el cual se liga a los anticuerpos porcinos compuestos con el antígeno del *M. hyopneumoniae*. El conjugado no ligado, es removido por lavado y se adhiere a los pocillos el sustrato que contiene cromógeno, dando como resultado una reacción de color mensurable. La reacción se expresa como una Densidad Óptica (DO), o como el radio del cambio de color de la muestra comparada con el control positivo (s/p) (Halbur, 1997)..

El detergente neutral Tween 20, extrae las proteínas de membrana de las células muertas de *M. hyopneumoniae*, así se reducen las proteínas mayores a 90 KDa y menores a 31 KDa (Calsamiglia *et al*, 1999).

Al comparar el ELISA indirecta con la prueba de Fijación de Complemento, esta última detectó anticuerpos dos semanas post infección, mientras que ELISA lo hizo a las tres semanas. Sin embargo los anticuerpos pudieron ser detectados en bajos niveles por un año con ELISA pero no fueron detectados después de 5 meses con la fijación de complemento.

Los porcinos no vacunados infectados natural o experimentalmente con *M. hyopneumoniae* desarrollan un pico de anticuerpos medidos por ELISA de 0.2 a 0.4 de DO, mientras que porcinos vacunados previos a la exposición o inoculación con

M. hyopneumoniae, muestran valores pico de DO mayores a 0.7 a 1.0. Además, las vacunas tienden a inducir valores de DO mas altos que la infección natural o experimental. Valores entre 0.2 y 0.26, pueden deberse a infección temprana, parte final de la infección o indica una reacción cruzada con *M. flocculare* (Halbur, 1997).

ELISA indirecta, ha sido utilizado para monitorear y verificar la prevención de *M. hyopneumoniae* en un hato implementado con un programa de bajo costo de Destete Temprano Modificado Medicado (Halbur, 1997). Clark (1997) revisó estudios en donde *M. hyopneumoniae* fue eliminado utilizando el DST, y la prueba de ELISA fue utilizada para sustentar estos descubrimientos. Moore (1997), usó la prueba para evaluar la eficacia de diferentes programas de vacunación contra *M. hyopneumoniae*.

2.6.2.2.2 ELISA De Bloqueo

Usada en Europa, es altamente sensible (98 a 100 %) y moderadamente específica (93 a 100 %). En esta prueba, una cantidad conocida de enzima ligada al suero positivo o anticuerpos monoclonales es adherida a los pocillos cubiertos de antígeno. Los anticuerpos en el suero problema, compiten con los anticuerpos ligados a enzima, causando el cambio de color cuando el sustrato es adherido.

Por el uso de anticuerpos monoclonales, es posible un incremento en la especificidad a nivel epitomal, por lo que detecta anticuerpos de infecciones con cepas de campo de *M. hyopneumoniae* y no detecta anticuerpos contra otros micoplasmas no patógenos más cercanos como el *M. flocculare* (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 positivo con ELISA indirecta (Stevenson, 1999).

La respuesta positiva a anticuerpos fue detectada dos semanas post infección y la respuesta mas alta a las 8 a 9 semanas, para luego comenzar gradualmente a decaer. Con esta prueba, la seroconversión fue de 6 a 8 semanas después de sucedido el pico de neumonía, también demostró que la Ig G responde a *M. hyopneumoniae* lentamente porque el organismo es pobremente invasivo, además se debe tener en cuenta estas 6 a 8

semanas de demora cuando se realicen perfiles serológicos para determinar tiempos de medicación y programas de vacunación. En otro ensayo la seroconversión fue detectada 3 semanas post infección. (Halbur, 1997)

Una comparación de ambos tipos de ELISA determinó que ELISA De Bloqueo detecta anticuerpos por un periodo mas largo de tiempo que ELISA indirecto, pero la seroconversión es detectada antes con el ELISA indirecto, en general existe una excelente concordancia entre las dos pruebas. Con el uso de un antígeno de superficie recombinante (46 kDa) en la prueba de ELISA, los anticuerpos pueden ser detectados dos semanas post infección (Halbur, 1997)

2.7 Control y Prevención

Para el control de la neumonía micoplásmica, son necesarios el uso de antibióticos, vacunas (cuando los problemas son muy severos), estrategias de manejo, y una muy buena bioseguridad. Para desarrollar programas de control y prevención lo más importante es identificar en que momento los animales se infectan, para poder establecer una estrategia de control apropiada (Cuevas, 2000).

2.7.1 Control por Erradicación

La eliminación de todos los porcinos de la granja y la repoblación con Porcinos Libres de Patógenos Específicos (SPF) fue desarrollado para controlar la Neumonía Enzoótica y la Rinitis Atrófica (Blood, 1986). Sin embargo, su costo inicial y potencial para la reinfección limitó su adopción por los productores comerciales (Clark, 1997).

Actualmente en Europa, se está aplicando con éxito un programa en granjas pequeñas. El programa se basa en la eliminación de los animales menores de 10 meses de edad, mientras el resto es tratado con antibióticos anti micoplásmicos, evitándose los partos por 15 días. Este sistema no ha sido validado para granjas grandes (Pijoan, 2002)

2.7.2 Control por Medidas de Manejo y Bioseguridad

El control eficaz de la enfermedad, depende de proporcionar un ambiente óptimo, que incluye la calidad del aire, ventilación, temperatura, y la densidad de población apropiada (Ross, 2000).

El sistema “Todo dentro, todo fuera” es un método eficaz. En un estudio porcinos criados bajo este sistema no desarrollaron la expresión clínica ni lesiones de neumonía aunque manifestaron anticuerpos contra *M. hyopneumoniae* (Clark, 1997).

El sistema de Producción Multisitio incorpora principios de destete medicado precoz (destete entre los 10 a 21 días) y la cría en grupos. En unidades grandes puede manejarse sin el costo de la eliminación y repoblación, además los porcinos mejoran su performance de crecimiento y reducen la expresión clínica de la enfermedad. (Harris, 1989 en Clark, 1997).

El Destete Segregado Temprano es una tecnología implementada en los últimos años (Clark, 1997). Algunos estudios demuestran que mediante este sistema los porcinos se mantienen libres del agente y seronegativos (Clark, 1999). Sin embargo, los otros agentes que no son eliminados por este sistema, son probablemente los agentes estresantes líderes que permiten a los porcinos subclínicamente infectados con *M. hyopneumoniae* desarrollar la enfermedad clínica y comenzar el contagio (Clark, 1997).

2.7.2 Vacunación

Es el método de control mas usado contra *M. hyopneumoniae* (Erlandson *et al*, 2002). Las vacunas son preparaciones inactivadas consistentes en organismos muertos y/o sus membranas, inducen anticuerpos séricos, pero proveen limitada protección contra micoplasma y no previenen la colonización de los pulmones. (Thacker E, 1997).

Las vacunas disponibles en el mercado, muestran efectos promisorios para lograr la reducción de lesiones pulmonares por la limitación de infecciones secundarias (Camacho, 2000). Además, son efectivas sobretodo en términos productivos y económicos (Cowan, 1997; Calle y Valdivia, 1999; IPVS, 2000; Roof *et al*, 2001; Dominiek *et al*, 2000; Khun, 2002).

Vacunar con cualquiera de las vacunas comerciales disponibles en el mercado es mejor que no vacunar, al no haber diferencias en cuanto a respuesta inmunitaria (Thacker E, 1997). Aunque existen diferencias en el número de dosis, seroconversión, lesiones pulmonares y ganancia de peso (Roof *et al*, 2001).

La vacunación con una sola dosis puede proteger al cerdo frente a un desafío de 18 semanas post vacunación. (Truchan, 1999) , pero esta se recomienda en granjas estables, con baja presión de otras enfermedades, con un estricto sistema todo dentro todo fuera y debe ser aplicada en presencia mínima de anticuerpos maternos. La vacunación con dos dosis se recomienda cuando existe presión de infección por otros patógenos, y en granjas de Flujo continuo o granjas que no puedan llevar un sistema estricto de Todo dentro Todo fuera (Yeske, 2001).

Un aspecto importante de la vacunación, es precisar el momento de la aplicación de la vacuna, para lo cual se debe hacer un perfil de anticuerpos de los lechones (Cuevas, 2000). De manera contraria a lo que suceden con otras vacunas, los lechones no tienen que ser negativos a los anticuerpos maternos para que la vacunación sea exitosa (Thacker B, 2001).

III. Materiales y Métodos

3.1 Lugar del estudio

El estudio se realizó en una granja porcina de crianza intensiva, ubicada en el distrito de Puente Piedra, en la provincia de Lima. Las muestras de suero colectadas, fueron procesadas en el laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.2 Sistema de Manejo de los porcinos en la granja

La granja es de producción en un solo sitio y cuenta con plantel reproductor de 600 madres. Al nacimiento y después de haber ingerido el calostro, los lechones son uniformizados tomando en cuenta su tamaño y número de lechones de la camada, el periodo de lactación dura 19 ± 2 días, al término, los lechones son trasladados al área de recría donde permanecen hasta los 70 días de edad, en esta etapa los lechones son nuevamente uniformizados y distribuidos en jaulas de acuerdo a su peso. Al término de la etapa de recría los gorrinos son trasladados al engorde donde se distribuyen en corrales con piso de cemento, en esta etapa nuevamente son uniformizados de acuerdo al tamaño y sexo, permaneciendo hasta llegar al peso de beneficio (90 Kg de peso vivo), que algunos gorrinos pueden alcanzar a los 130 días de edad.

En la granja los lechones son vacunados contra Cólera porcino (45 días de edad), Rinitis Atrófica (7 y 21 días de edad) y Erisipela Porcina (36 días de edad), no se vacuna contra *Mycoplasma hyopneumoniae*.

La bioseguridad en la granja es muy estricta, todos los vehículos que ingresan son lavados y desinfectados, para poder ingresar tanto las visitas como los trabajadores se bañan y utilizan la ropa proporcionada por la granja. Existe una delimitación definida de la zona limpia y la zona sucia, y al ingreso de las instalaciones de todas las áreas existen pediluvios con desinfectante. Además, la granja utiliza el sistema de manejo “Todo dentro Todo fuera”, lo que permite un buen manejo sanitario de las instalaciones. Sin embargo, la granja continuamente tiene problemas de tipo respiratorio.

3.3 Animales y Tamaño de la muestra

Para el ensayo, se seleccionaron al nacimiento 30 lechones, el número de animales que participaron se determinó utilizando el “Teorema del Limite Central”, según el cual una muestra de 30 animales es suficiente para el diseño de este estudio (Daniel, 1996).

El 50 % de los lechones seleccionados fueron hembras y el otro 50 % machos. Todos los animales seleccionados procedían de madres multíparas (2, 3, y 4 partos) y se encontraban en buen estado de salud al inicio del ensayo.

Para la identificación, los lechones fueron tatuados en la oreja con un número de dos dígitos, de esta manera se pudo realizar el seguimiento individual de cada animal y registrar la procedencia según su madre. Una vez identificados, los lechones fueron uniformizados y distribuidos por el personal de la granja de acuerdo a su tamaño pero manteniéndolos en el mismo cuarto del área de maternidad y en el mismo lote en las etapas posteriores y con porcinos de su misma edad.

Las prácticas de manejo y el programa sanitario utilizados con estos animales fueron los que normalmente se emplean en la granja.

3.4 Materiales usados durante el muestreo

- Tubos Vacutainer
- Agujas para Vacutainer (1' x 22 y 1' ½x 20)
- Soporte (Holder)
- Algodón
- Tintura de yodo

3.5 Materiales y equipos usados en el laboratorio

- Centrífuga
- Viales
- Congeladora
- Pipetas simples y multicanales
- Tips
- Kit de Elisa para detección de anticuerpos contra *Mycoplasma hyopneumoniae* CHEKIT®-Hyoptest-II (Placas de ELISA y Reactivos)
- Agua destilada
- Erlenmeyer
- Espectrofotómetro

3.6 Análisis Estadístico

Se utilizó la prueba de Kaplan Meier para analizar la curva de sobrevivencia de los animales que participaron en el ensayo, de esta manera se pudo observar mejor el comportamiento de los animales que se mantuvieron libres de la infección y el momento en el cual seroconvirtieron el mayor porcentaje de animales.

Para evaluar la relación entre el momento de infección con las variables de sexo y número de partos de la madre, se utilizó la prueba de Regresión de Cox con un intervalo de confianza del 95 %.

3.7 Método de colección de las muestras

Las muestras de sangre, se extrajeron mediante la técnica de Punción de la Vena Cava y con el sistema de Tubo al vacío. Las muestras se colectaron con intervalos de 2 semanas desde el segundo día de edad hasta las 16 semanas de vida.

Cada muestra fue rotulada con la edad y el número del tatuaje del animal a la que pertenecía, las muestras fueron llevadas al laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM para la extracción de los sueros mediante centrifugación.

Los sueros fueron almacenados en viales a temperatura de congelación hasta el momento en que se realizó la prueba serológica.

3.8 Método de Detección de anticuerpos

Procedimiento

3.8.1 Preparación de reactivos

- a. Se equilibraron todos los reactivos a la temperatura ambiente
- b. Se determinó la cantidad necesaria de la Solución de Dilución y Lavado del Kit, para esto se diluye la solución CHEKIT-10x-Concentrate en razón de 1:10, es decir una parte del concentrado en nueve partes de agua destilada, la cual debe tener un pH entre 5.5 y 6.0.

3.8.2 Dilución, distribución e incubación de muestras y controles.

- a. En cada pocillo de la placa que se utilizó, se colocaron 90 μ l de la solución preparada anteriormente.
- b. Se añadió 10 μ l del suero problema y de los controles en los pocillos apropiados de la placa.
- c. El contenido de cada pocillo se mezcló con una suave agitación de la placa.
- d. Se procedió a la incubación de la placa a una temperatura ambiente de 18° a 25° en una cámara húmeda, y por 90 minutos

3.8.3 Lavado de la placa

- a. Después de la incubación, se sacudió firmemente la placa para vaciar los pocillos, después se llenó cada uno con 300 μ l de la solución de lavado evitándose la formación de burbujas. Esta operación se repitió dos veces. Luego, se sacudió la placa completamente para vaciar los pocillos y se golpeó firmemente sobre una papel absorbente para favorecer la operación.

3.8.4 Dilución, distribución e incubación del conjugado

- a. Se diluyó el conjugado Peroxidasa – Anti Inmunoglobulina porcina CHEKIT, en una relación de 1:200 en la solución de Lavado y Dilución CHEKIT.
- b. Se dispensaron 100 μ l de la solución arriba mencionada en cada pocillo y se incubó la placa por 90 minutos, en las condiciones ambientales ya mencionadas.

3.8.5 Adición del cromógeno

- a. Se lavó nuevamente la placa con la técnica mencionada anteriormente.
- b. A cada pocillo se adicionó 100 μ l del Cromógeno CHEKIT pre calentado a 25°C.
- c. Después de 30 minutos y ocurrida la reacción se adicionó 50 μ l de la solución Stoper CHEKIT pre calentada a la temperatura ambiente.

3.8.6 Lectura e interpretación de los resultados

- a. La lectura se llevó a cabo con un espectrofotómetro con una longitud de onda de 405 nm.
- b. Los resultados obtenidos fueron válidos ya que la diferencia de la Densidad Óptica (DO) del control Positivo y el control Negativo fue mayor a 0.3.
- c. Para la interpretación de los resultados se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Valor} = \frac{\text{DO}_{\text{muestra}} - \text{DO}_{\text{neg.}}}{\text{DO}_{\text{pos.}} - \text{DO}_{\text{neg.}}} \times 100 \%$$

- d. Si el resultado fue mayor a 30 % la muestra se consideró positiva, si el valor fue menor al 20 % la muestra fue considerada negativa, y si el valor resultante se encontró entre el 20 y el 30 % la muestra se consideró sospechosa lo que indicaría que el animal estaría saliendo de la infección o comenzando una, por lo que se recurrió a la muestra anterior y posterior del mismo animal para determinar su verdadero diagnóstico.

IV. Resultados

Desde el nacimiento, y hasta las cuatro semanas de edad, el 100 % de los animales tuvieron anticuerpos contra *Mycoplasma hyopneumoniae* (Gráfico 1). Observándose a partir de la sexta semana de edad, una disminución en el porcentaje de los animales seropositivos, manteniéndose la tendencia hasta las diez semanas de edad, donde solo un 3.3 % de animales presentaron anticuerpos. A las 12 semanas de edad, se observó un aumento que llegó ser del 36.7 % de los animales muestreados, disminuyendo esta proporción hasta las 16 semanas de edad (Gráfico 1). Determinándose que el 66.7% de los animales muestreados (20/30), seroconvirtieron por infección con *M. hyopneumoniae*.

Mediante la prueba de Kaplan Meier, se puede ver que el momento en el cual seroconvirtieron la mayor proporción de animales infectados, 55.0 % (11/20) fue a las 12 semanas de edad, mientras que el resto de los animales 5 % (1/20), 30 % (6/20) y 10% (1/20), seroconvirtieron a las 10, 14 y 16 semanas de edad respectivamente (Gráfico 2).

El porcentaje de animales que seroconvirtieron, fue similar en ambos sexos hasta las seis semanas de edad, pero a las ocho semanas de edad, se observa un mayor porcentaje de seropositivos en el grupo de los machos (46.7 % sobre 40% de las hembras), aunque a partir de las doce semanas de edad la seroprevalencia es ligeramente superior en las hembras hasta el final del estudio (Gráfico 3).

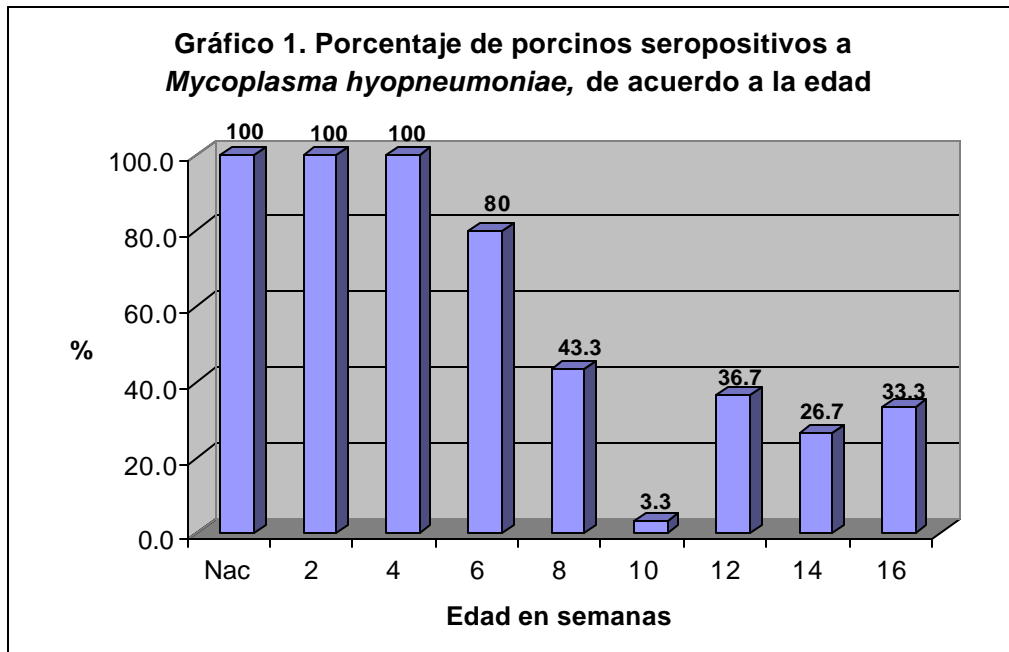
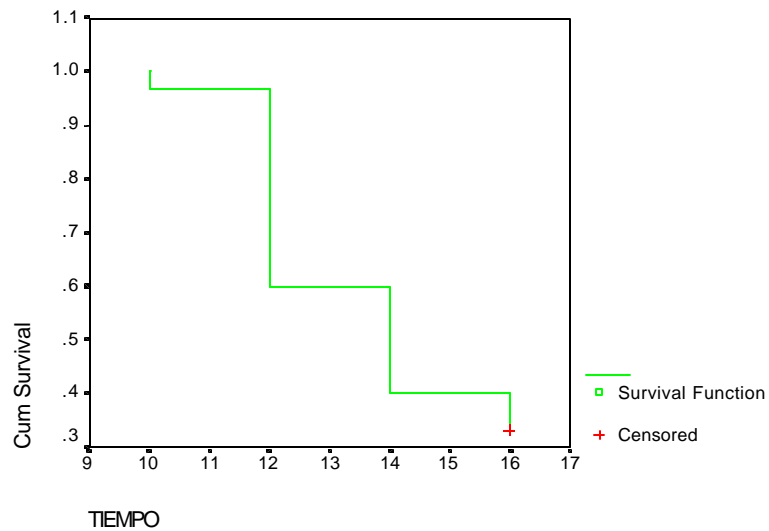


Gráfico 2. Comportamiento de los porcinos que se mantienen libres de la infección con *Mycoplasma hyopneumoniae*.



Prueba de Kaplan Meier

La Prueba de Kaplan Meier para la variable sexo muestra que no hay diferencias en ambos grupos en cuanto a momento de seroconversión (Gráfico 4), lo que fue confirmado por la prueba de Regresión de Cox, que demuestra que no existe diferencia estadística significativa en el momento de infección de ambos sexos ($p = 0.986$).

En cuanto a la influencia del número de partos de la madre, el mayor porcentaje de animales que son seropositivos al *M. hyopneumoniae* proceden de madres de tercer parto (Cuadro 1).

Mediante la Prueba de Kaplan Meier, se determinó que el mayor porcentaje de animales que seroconvirtieron a las doce semanas, proceden de madres de segundo parto, mientras que el mayor porcentaje de animales que seroconvierten recién a las 16 semanas de edad, proceden de madres de cuarto parto. En el caso de los porcinos que proceden de madres de tercer parto, estos mostraron una curva de seroconversión casi constante desde las diez semanas de edad hasta el final del ensayo (Gráfico 5). Sin embargo, mediante la prueba de Regresión de Cox, se demostró que no existe influencia del número de partos de la madre en el momento de la seroconversión.

Cuadro 1. Número y porcentaje de porcinos seropositivos y seronegativos a *Mycoplasma hyopneumoniae* de acuerdo al número de parto de la madre de la que proceden.

Parto	Número de animales	Seropositivos	Seronegativos
2 ^{do} parto	16 (53.3 %)	10 (62.5 %)	06 (37.5 %)
3 ^{er} parto	08 (26.7 %)	06 (75.0 %)	02 (25.0 %)
4 ^{to} parto	06 (20.0 %)	04 (66.7 %)	02 (33.3 %)
Total	30 (100 %)	20 (66.7 %)	10 (33.3 %)

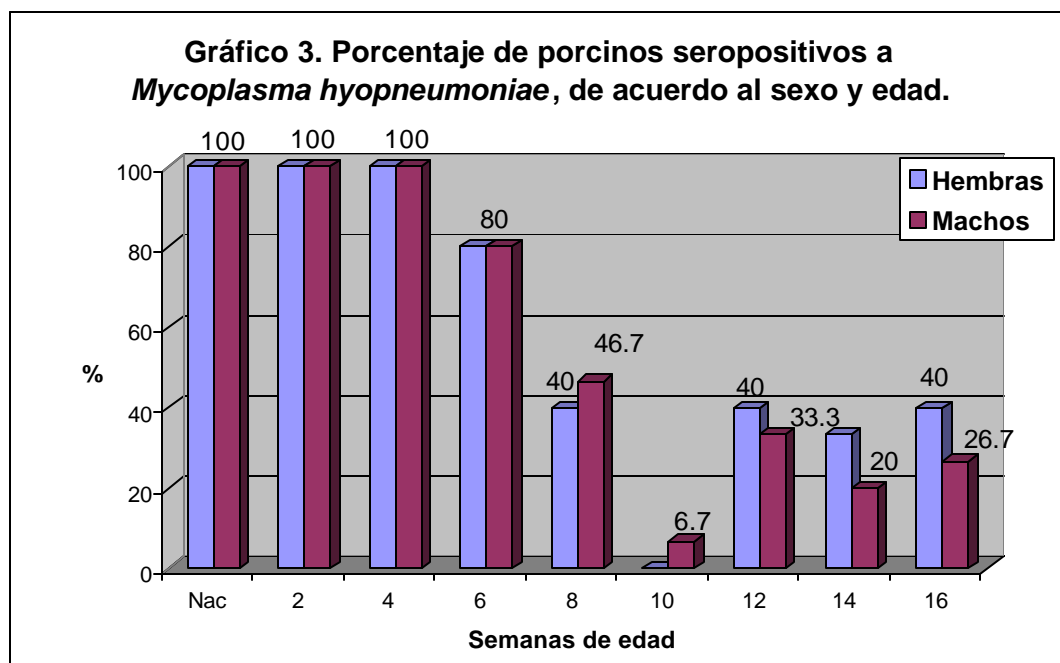


Gráfico 4. Comportamiento de los porcinos machos y hembras que se mantienen libres de la infección con *Mycoplasma hyopneumoniae*.

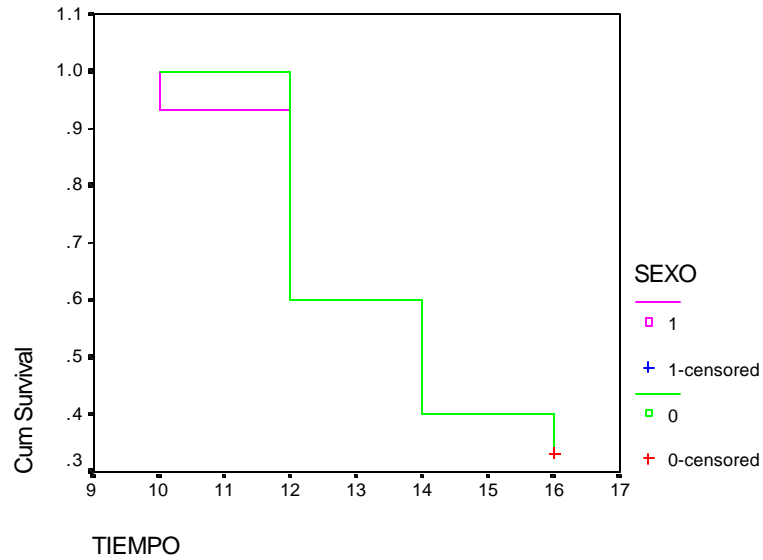
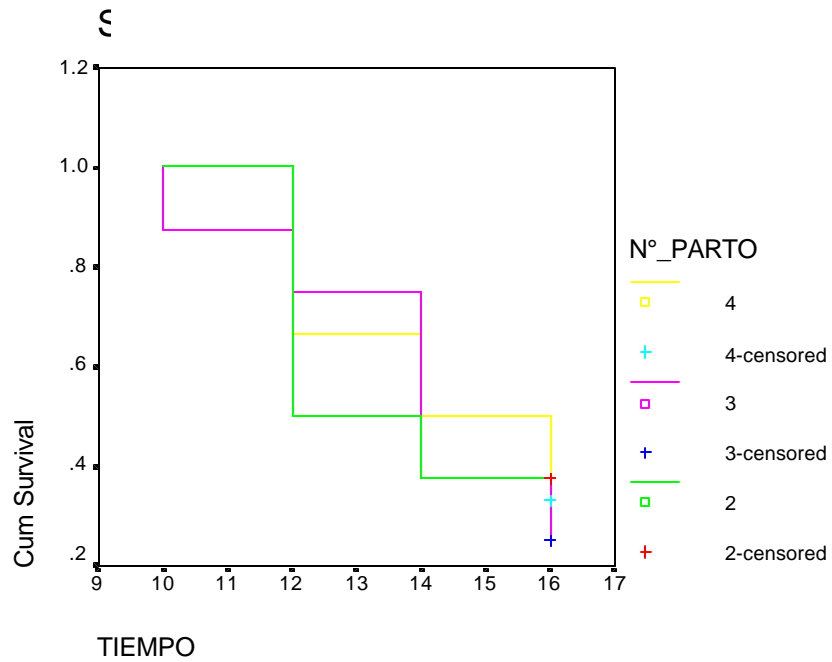


Gráfico 5. Comportamiento de los porcinos que se mantienen libres de la infección con *Mycoplasma hyopneumoniae*, de acuerdo al número de partos de la madre que proceden



V. Discusión

El *Mycoplasma hyopneumoniae*, es el agente causal de la enfermedad respiratoria porcina de mayor implicancia económica en el ámbito mundial, su demostrada tendencia a predisponer infecciones secundarias, y potenciar a otros agentes patógenos respiratorios, hace que su control sea el primer paso para el éxito de la prevención de la enfermedad respiratoria porcina.

El presente estudio, determinó serológicamente mediante una prueba comercial de ELISA indirecta, la infección con *Mycoplasma hyopneumoniae* en porcinos de una granja tecnificada de Flujo continuo. Si bien es cierto, que por la naturaleza del agente es difícil precisar el momento exacto de la infección mediante serología, este estudio ha demostrado que la prueba es eficaz para determinar la exposición al agente y la etapa de cría en la cual el individuo sufrió el mayor grado de exposición, de la misma forma que ha permitido caracterizar y evaluar el estado inmunitario del sistema de producción.

Como se puede observar en el Gráfico 1, existe un alto nivel de anticuerpos contra *M. hyopneumoniae* al nacimiento y la seropositividad del 100% de los lechones hasta la cuarta semana de edad, esto debido a una alta tasa de transferencia de los anticuerpos calostrales de la madre al lechón, lo que demuestra la gran actividad del agente en el hato reproductor de esta unidad de producción, ya que se tratan de madres no vacunadas, y al hecho que existe una correlación positiva entre los niveles de anticuerpos de las madres y sus lechones (Clark, 1999).

La infección en marranas, se debe a que en sistemas de flujo continuo, existe una mayor actividad de este microorganismo al haber animales infectados en la recría y en el engorde, lo que aumenta la presión de infección en marranas (Suprenant, 2001).

Los anticuerpos maternos de los lechones que son amamantados por madres infectadas naturalmente, decrecen gradualmente en un periodo de seis semanas (Thacker, 1997). Sin embargo, en este estudio los anticuerpos maternos cayeron en forma constante hasta las ocho semanas de edad (Gráfico 1). Estos resultados también difieren de los observados por Clavijo *et al* (2002), quien encontró que los anticuerpos maternos permanecieron en el 63% de los lechones hasta los 45 días de edad. El presente estudio demostró, que el 80 % de los animales tenía anticuerpos maternos a los 42 días de edad; igualmente Clark (1999), halló resultados diferentes al reportar que los anticuerpos maternos persistieron por 3 semanas en lechones hijos de madres no vacunadas.

Es posible observar diferencias en los niveles de anticuerpos entre individuos de diferentes camadas e inclusive entre hermanos de camada. La diferencia entre camadas, se explicaría porque en las marranas el nivel de anticuerpos contra *M. hyopneumoniae* varía con el número de partos (Clark, 1999). 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 del calostro. Estos resultados confirman a Thacker (1997), quien dice que el nivel y duración de los anticuerpos maternos son extremadamente variables entre individuos y hatos.

Con respecto a la determinación serológica de la infección con *M. hyopneumoniae*, la prueba de Kaplan Meier demostró que la mayor parte de los animales seroconvirtieron a las doce semanas de edad (Gráfico 2). Este resultado, junto con la observación del comportamiento serológico que tuvieron los animales hasta esta edad, indicaría que el periodo crítico para los porcinos que participaron en el ensayo fue entre las nueve y las diez semanas de edad, es decir al final de la etapa de recría, lo que confirma la hipótesis del estudio.

El resto de gorrinos que seroconvirtieron lo hicieron entre las catorce y las dieciséis semanas de edad. La variación en la edad de la seroconversión, puede deberse a la variación biológica en la fuerza de la respuesta inmune humoral que existe entre individuos con igual estímulo antigénico (Stevenson, 1999). Aunque también, podría deberse a que los gorrinos que seroconvirtieron tardíamente a las 16 semanas, se infectaron durante las primeras semanas de la etapa de acabado al ponerse en contacto con animales seropositivos.

El hallazgo más importante del estudio, radica en que se ha demostrado que para el desarrollo de la infección con *M. hyopneumoniae*, es más importante la ausencia de anticuerpos maternos en la mayor parte de la población y no solo en algunos individuos. Al observar los resultados a la sexta semana de edad, un 20 % de los lechones ya no cuentan con anticuerpos maternos (Gráfico 1), y teniendo en cuenta los estudios realizados por Thacker (1999b), en los que demostró la importancia de esta protección en el momento de la presentación y severidad de la infección, se presumiría que los porcinos susceptibles al desarrollo de la infección por la ausencia de anticuerpos seroconvertirían antes. Sin embargo, como podemos observar en los resultados, la mayoría de los animales no seroconvirtieron sino hasta las doce semanas de edad, mientras que solo un gorrino lo hizo a las 10 semanas de edad. Por otra parte, en los animales cuya inmunidad materna persistió más allá de las ocho semanas de edad, la seroconversión se dió de igual manera a partir de las doce semanas de edad. Para confirmar esto, es necesario tener en cuenta los resultados de datos no publicados de Calle (2003), en los cuales las muestras de hisopados nasales, evaluados mediante la prueba de PCR, se encontró que el 100 % de los animales fueron positivos a *M. hyopneumoniae* desde las dos hasta las dieciséis semanas de edad.

Se sabe que la inmunidad materna contra *M. hyopneumoniae*, previene al individuo del desarrollo de lesiones mientras es expuesto al contagio (Jayappa et al, 2001), y por lo observado en este ensayo la persistencia de la inmunidad en algunos individuos del grupo sería útil para disminuir la presión de la infección en la población. Sin embargo, cuando la mayor parte o el total de los animales del lote ya no contaron con la protección de la inmunidad pasiva, que serían el 97 % de los animales a las 10 semanas de edad, la actividad del *Mycoplasma hyopneumoniae* aparentemente se hizo más

intensa, de esta manera, los gorrinos comenzaron a seroconvertir aproximadamente dos semanas después.

Es necesario señalar que, no solo el estado inmunitario de la población contribuye al desarrollo del micoplasma, sino que algunos factores ambientales estarían involucrados (Janke, 1997). Recordemos que el periodo, que el estudio ha señalado como crítico que sería entre las nueve y diez semanas de edad, coincidió con las últimas semanas de los gorrinos en el área de recría y el traslado de estos al área de engorde. En la recría, a esa edad, el alto consumo de los gorrinos, trae como consecuencia una mayor eliminación de desechos orgánicos que originan un aumento en la concentración de gases, los cuales son muy difíciles de manejar en ambientes de ventilación natural, lo que crea situaciones a favor del organismo dentro del tracto respiratorio por la disminución de los mecanismos de defensa (Thacker, 1999b). Además, el crecimiento y el aumento en la ganancia diaria de peso hace que se disminuya el área por animal y por lo tanto el volumen de aire por kilogramo de peso vivo, lo que representa un factor importante en la presentación de problemas respiratorios en porcinos criados en confinamiento. Con respecto al traslado al engorde, produce estrés en los animales no solo por movimiento y cambio de ambiente, sino por el reagrupamiento de los animales de acuerdo al tamaño y al sexo. Todos estos factores sumados al estado inmunitario de la población contribuirían a una actividad más intensa del micoplasma, iniciando la seroconversión aproximadamente dos semanas después.

De los resultados de este estudio, podemos afirmar que el micoplasma habría infectado a los animales en la etapa de lactación, manteniendo colonizadas las vías áreas y controlado pero no eliminado por la inmunidad materna. Esto no solo se puede deducir por los resultados no publicados de Calle (2003), sino además porque en la granja se practica el sistema Todo dentro todo fuera, con lo que se puede asegurar que no hubo animal que haya ingresado al grupo después del destete y mucho menos a las nueve semanas de edad que pueda haber servido de fuente de infección.

Cabe señalar, que no todos los animales seroconvirtieron, lo que no indica que se hayan mantenido libres de la infección, sino que se deba a la variación biológica que existe entre individuos.

Se puede decir, que para el control de la infección con *M. hyopneumoniae*, deberíamos tener en cuenta el manejo de los factores que lo están predisponiendo, es decir el estado inmunitario, la calidad de aire que los porcinos reciben y el estrés característico de esta fase de la crianza.

Con respecto al estado inmunitario, podríamos presumir que el uso de vacunas, ayudaría para evitar el “vacío inmunitario” y asegurar la presencia de la inmunidad tanto celular como humoral alrededor de las nueve semanas. Sin embargo, para determinar el momento de la vacunación es necesario tener en cuenta la presencia de la inmunidad materna al momento de la aplicación, si bien es cierto que de manera contraria a lo que suceden con otras vacunas, los porcinos no tienen que ser negativos a los anticuerpos maternos para que la vacunación sea exitosa (Thacker B, 2001), también se ha demostrado que niveles elevados de anticuerpos maternos al momento de la vacunación pueden ser negativos en su respuesta (Thacker, 1998; Jayappa *et al*, 2001, Carranza *et al*, 2002). De acuerdo a este estudio, podríamos decir que el momento adecuado para la aplicación de una vacuna contra *M. hyopneumoniae*, sería alrededor de las ocho semanas de edad.

En lo concerniente al manejo de la ventilación, para mejorar la calidad de aire, lo recomendable sería mejorar la eficiencia de los sistemas de ventilación natural, un buen manejo de las cortinas, acompañado de una buena limpieza y eliminación de las heces y orina, pueden ser herramientas útiles para mejorar el ambiente en esta fase de la producción. Con respecto al estrés, producto del traslado y reagrupamiento de los animales en el engorde, poco se puede hacer, aunque un buen manejo de los animales en la etapa de recría reduciría la variación en el peso vivo de los animales, con lo que en el engorde se podría conservar el grupo de animales formado en la recría, y así reducir el estrés por el reagrupamiento.

Por otro lado, los datos encontrados en la seropositividad de los animales de acuerdo a la edad, deben tomarse en cuenta para estudios de prevalencia, ya que al hacer un muestreo de animales menores a 8 semanas de edad, puede manifestarse un alto porcentaje de seroreactores pero no por infección sino por la persistencia de anticuerpos maternos, de igual manera un muestreo a las 10 semanas de edad o más allá de las 16

semanas, nos pueden dar como resultado prevalencias bajas lo que no sería realmente un indicativo de la situación de la infección.

Este estudio ha confirmado a Clark (2000), quien menciona que el mejor periodo para determinar si ha existido exposición al *M. hyopneumoniae* durante la recría es dos semanas después que ha terminado dicho periodo, en el presente estudio el periodo de recría culminó a las diez semanas de edad, y el mayor porcentaje de animales infectados seroconvirtieron a las 12 semanas de edad (Gráfico 2); de igual manera si lo que se quiere es evaluar la transferencia de calostro, este estudio ha demostrado que es posible evaluarla a partir de las dos semanas de edad, sin mayor variación en los resultados.

El estudio ha demostrado que muchos de los porcinos que se infectaron con *M. hyopneumoniae*, desarrollaron lecturas de DO superiores a 0.4, sobretodo a partir de las 14 semanas de edad, diferente de lo encontrado por Halbur (1997) quien menciona que los porcinos infectados natural o experimentalmente desarrollan títulos medidos por ELISA indirecta en rangos de 0.2 a 0.4.

En cuanto al efecto del sexo de los animales, en el momento de la infección con micoplasma, la prueba de Kaplan Meier (Gráfico 4) y la Regresión de Cox no encontraron diferencias significativas entre ambos sexos. Sin embargo, otros autores mencionan que existe una mayor prevalencia de neumonía y pleuritis en machos castrados que en hembras (Christensen et al, 2000), aunque este no sea el caso ya que se trabajaron con machos enteros, y quizás porque la cría durante la etapa de recría fue mixta, separándose a los animales por sexo durante la etapa de acabado, cuando ya los animales estaban infectados.

Mediante la regresión de Cox, se determinó que no existe influencia en el número de partos de la madre y el momento de seroconversión, aunque algunos estudios mencionan que las marranas a partir del cuarto parto, las marranas poseen una doble concentración de anticuerpos que al tercer parto. Aun así, este incremento en los niveles de anticuerpos en marranas de más de tres partos indica que esta granja tiene un estado inmunitario inestable (Clark, 1999).

VI. Conclusiones

1. El 66.3 % de los porcinos que participaron en el ensayo, fueron seroreactores a *Mycoplasma hyopneumoniae*.
2. El 55 % de animales que se infectaron con *M. hyopneumoniae* seroconvirtieron a las doce semanas de edad.
3. El periodo crítico en el cual *Mycoplasma* inició su actividad fue entre las nueve y las diez semanas de edad.
4. El *M. hyopneumoniae* necesitó de la susceptibilidad inmunológica de casi toda la población y de factores externos estresantes para intensificar su actividad e iniciar la seroconversión.
5. El sexo y el número de partos de la madre son variables que no influyen en el momento de la infección con *M. hyopneumoniae*.
6. Los sueros de los animales infectados naturalmente pueden desarrollar valores de densidad óptica mayores a 0.4.

VII. Bibliografía citada

- 1 **Aldaz A. 2002.** Enfermedades respiratorias del cerdo: algunos aspectos prácticos a considerar en el diagnóstico y control para la resolución de casos clínicos. Rev. Anaporc, España, 21: 211.
- 2 **Amass S.F. and Clark L.K. 1999.** Biosecurity considerations for pork production units. Swine Health Prod. 7(5); 217 – 228.
- 3 **Andrada M, Fernández A, Del Pozo M. y Sánchez Vizcaíno JM. 2002.** Neumonía Enzoótica. En Curso virtual de enfermedades de los cerdos. Ed Sánchez Vizcaíno
- 4 **Blood D.C, Henderson JA, Radostits O.M, Arundel JH, Gay CC. 1986.** Medicina veterinaria. 5a Ed., p. 614-618. Interamericana S.A. Mexico D.F.
- 5 **Calsamiglia M, Pijoan C, and Bosch GJ. 1999.** Profiling *Mycoplasma hyopneumoniae* in farms using serology and nested PCR technique.
- 6 **Camacho, C. 2000.** Principales enfermedades que afectan a la Porcicultura Peruana. Memorias del II Congreso Nacional de Porcicultura & Expo Porcina 2000. Lima-Perú

- 7 **Carranza A, Pereira N, y Ambrogi A. 2002.** Interferencia de los anticuerpos maternos en la vacunación contra *Mycoplasma hyopneumoniae* de campo. En: Memorias I Congreso Latinoamericano de Suinocultura. Foz de Iguazú. p:17-18
- 8 **Christensen G, S rensen V, y Mousing J. 2000.** Enfermedades del sistema respiratorio. En: Enfermedades del cerdo. 8va Ed., Vol II, Cap 61, Ed. Straw B. Editorial Intermedica, Buenos Aires.
- 9 **Chung T., Farh L, Chen Y., and 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, Japón. 128:261-269
- 10 **Clark k. 1997.** Control or Eradication of Mycoplasmal Pneumonia. Proceedings of the Iowa State University Veterinary Medicine Seminar. p: 8 – 10.
- 11 **Clark LK, 1999 .** *Mycoplasma hyopneumoniae*: serology / vaccinology. Proceedings of the American Association of Swine Practitioners conference. St Louis. p: 339-343.
- 12 **Clark LK, 2000.** Pneumonia control strategies – Why they work...or don't!. Proceedings of the Swine Disease Conference for swine practitioners conference. Iowa. p: 112 – 118.
- 13 **Clavijo, A. M; Rolo M; Sandoval A; Ramirez de N C; Alfaro C; Peroza L; Tonelli A; y Alonso M.J. 2002.** Cinética de anticuerpos maternos e inducidos por una vacuna contra *Mycoplasma hyopneumoniae*. En: Memorias del I Congreso Latinoamericano de Suinocultura. Foz de Iguazu. p: 7-8
- 14 **Cornaglia E, Bonneau M, and Moreau I. 2002.** *Mycoplasma hyopneumoniae* titration: A powerful tool to understand antibody levels. In Proceedings of the American Association of Swine Veterinarians annual meeting. Kansas. p: 83 – 84

- 15 **Cowan , T. 1997.** Mycoplasmal Pneumoniae therapy. Proceedings of the Iowa State University Veterinary Medicine Seminar. p: 16 – 18.
- 16 **Cuevas, L. 2000.** Neumonías bacterianas, prevención y control. Memorias del II Congreso Nacional de Porcicultura & Expo Porcina 2000. Lima-Perú.
- 17 **Daniel W. 1996.** Bioestadística Base para el análisis de las ciencias de la salud. p: 139 – 170. Editorial Limusa. México.
- 18 **Desroisers R. 2001.** A review of some aspects of the epidemiology, diagnosis, and control of *M. hyopneumoniae* infections. J Swine Health Prod. 9(5); 233 – 237.
- 19 **Dominiek M, Verdonck M, Verbeke W, Viaene J, and Kruif A. 2000.** *Mycoplasma hyopneumoniae*: Benefit to cost of vaccination. In: Proceedings of the American Association of Swine Practitioners annual meeting. Indianapolis. p: 327- 333.
- 20 **Dudley S. 1997** Observations of Mycoplasma in Modern Production Units. Proceedings of the Iowa State University Veterinary Medicine Seminar. p: 14, 15
- 21 **Erlandson K, Thacker B, Bush E, Thacker E. 2002.** *Mycoplasma hyopneumoniae* seroprevalence and control strategies on farms participating in the National Animal Health Monitoring System (NAHMS) Swine 2000 survey. In Proceedings of the American Association of Swine Veterinarians annual meeting. Kansas. p: 31 – 34.
- 22 **Goodwin IA, 1982.** Neumonía enzootica porcina. International Swine update. Squibb Jul 1: 1 – 8.
- 23 **Halbur P. 1997.** Making the diagnosis with Serology, Antigen detection and PCR. Proceedings of the Iowa State University Veterinary Medicine Seminar. p: 3 – 7
- 24 **Huallanca A, 1999.** Determinación de reactivos positivos a *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos sacrificados en un camal frigorífico. Tesis Bachillerato. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor San Marcos, Lima.

- 25 Ibarra M, 2000.** Evidencia de la presencia de *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos provenientes de granjas de crianza artesanal. Tesis Bachillerato. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor San Marcos, Lima.
- 26 IPVS, 2000.** Congress reports gains from micoplasma vaccination. Pig International, Illinois, 30: 31
- 27 Janke B. 1997.** Pathogenesis of Mycoplasmal pneumonia, samples for diagnosis. Proceedings of the Iowa State University Veterinary Medicine Seminar. p: 1,2
- 28 Jayappa H, Davis R, Rapp - Gabrielson V, Wasmoen T, Thacker E, and Thacker BJ. 2001.** Evaluation of the efficacy of *Mycoplasma hyopneumoniae bacterin* following immunization of young pigs in the presence of varying levels of maternal antibodies. In Proceedings of the American Association of Swine Veterinarians annual meeting. Nashville. p: 237 – 241.
- 29 Backstrom L, Jolie R, Olson L, and Chase Ch. 1999.** Respiratory and systemic health parameters in pigs raised in a conventional farm or in isolation. Swine Health Prod. 7(6); 269 – 275.
- 30 Khun M. 2002.** Vaccine efficacy and production performance of pigs vaccinated with RespiSure – ONE™. In Proceedings of the American Association of Swine Veterinarians annual meeting. Kansas. p: 139 – 141.
- 31 Mogollón J, Rincón M, Arbeláez G, 2001.** Aplicaciones de la serología para el diagnóstico y control de las enfermedades porcinas en América Latina. Rev. ANAPORC, España, 22:221
- 32 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.

- 33 Murray R, Granner D, Mayes P, and Rodwell V. 1994.** Bioquímica de Harper. 13 ed. Editorial El Manual Moderno. Mexico. p: 135-142.
- 34 Nicolet, J. 1986.** Compendio de bacteriología médica veterinaria. 2ª ed. Editorial Acribia. España.
- 35 Ohlinger V., Pesch K., y Keller C. 2002.** Four diseases linked to Porcine Circovirus II. Pig International, Illinois, 32:17-20.
- 36 Pijoan, C. 2000.** Complejo respiratorio Porcino. Memorias del II Congreso Nacional de Porcicultura & Expo Porcina 2000. Lima-Perú.
- 37 Pijoan C. 2002.** Control de Mycoplasma y otras enfermedades respiratorias. En: Memorias I Congreso Latinoamericano de Suinocultura. Foz de Iguazú. p: 73 – 74
- 38 Ross RF. 1986.** Mycoplasmal Disease. In Disease of swine, 6ª ed. Cap 40, Ed A.D Leman. Iowa State University Press, Ames.
- 39 Ross, RF. 2000.** Enfermedades micoplásmicas. En: Enfermedades del cerdo. 8va Ed., Vol I, Cap 31, Ed. Straw B. Editorial Intermedica, Buenos Aires.
- 40 Roof MB, Burkhart K, and Zuckermann FA. 2001.** Evaluation of the immune response and efficacy of 1 and 2 dose commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. . Proceedings of the American Association of Swine Veterinarians annual meeting. Nashville. p: 163 – 167.
- 41 Stevenson G W. 1999.** Common mistakes in interpretation of population serology. Proc. of the American Association of Swine Practitioners. St. Louis. p: 339-343.
- 42 Stipkovits L, 1995.** Neumonía por micoplasma en el cerdo. PIGS Misset. Sept. p: 18-19.

- 43 Surprenant Ch. 2001.** *Mycoplasma hyopneumoniae*: serologic interpretation of herd profiles. Proceedings of the American Association of Swine Veterinarians annual meeting. Nashville. p: 477.
- 44 Thacker EL. 1997.** Mycoplasma Vaccines: What we Know, what we don't know. Proceedings of the Iowa State University Veterinary Medicine Seminar. p: 11-13
- 45 Thacker, B; Boettcher T, Anderson E, Thacker E, and Young T. 1998.** The influence of passive immunity of serological responses to *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination. Proceedings of the 15th IPVS Congress, Birmingham.
- 46 Thacker EL, Halbur PG, and Thacker BJ. 1999. (a)** Effect of vaccination on dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and PRRSV. Proceedings of the American Association of Swine Practitioners annual meeting. St Louis. p: 375 – 377.
- 47 Thacker EL and Thacker BJ. 1999. (b).** *Mycoplasma hyopneumoniae* and PRRS in the finisher. Proceedings of the American Association of Swine Practitioners annual meeting. St. Louis. p: 483 – 485.
- 48 Thacker EL; Halbur, P; Ross, F; Thanawongnuwech, R; y Thacker, B; 1999. (c).** *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome-virus induced pneumonia. J. Clin Microbiol, 37: 620-627.
- 49 Thacker EL, 1999 (d).** Mycoplasma research efforts – What are we learning?. Proc. of the Swine Disease Conference for swine practitioners. Iowa. P: 107 – 111.
- 50 Thacker EL, 1999 (e).** Mycoplasma vaccines: commercial and autogenous, my experiences. Proceedings of the Swine Disease Conference for swine practitioners. Iowa. P: 77 – 79.
- 51 Thacker BJ, Hawkins PA, and Water WR. 2000.** Evaluation of the mode of action of Respisure® *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin. Proceedings of the American Association of Swine Practitioners annual meeting. Indianapolis. p: 123.

- 52 Thacker EL. 2001.** Mycoplasma diagnosis and immunity. . Proceedings of the American Association of Swine Veterinarians annual meeting. Nashville. p: 467 – 469.
- 53 Thacker BJ and Thacker EL. 2001,** Influence of maternally – derived antibodies on the efficacy of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin. Proc. of the American Association of Swine Veterinarians annual meeting. Nashville. p: 513 – 516.
- 54 Truchan L, Jolie R, Runnels P. and McGavin D. 2000.** Eighteen week duration of immunity in pigs vaccinated at 3 or 8 weeks of age with one dose of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin. Proceedings of the American Association of Swine Practitioners annual meeting. Indianapolis. p: 125.
- 55 Valdivia L., y Calle S.. 1999.** Respuesta a la vacunación contra Neumonía enzoótica Porcina en términos de producción en explotación intensiva de cerdos. Rev. Investigaciones Veterinarias del Perú, Lima. 10:71-73.
- 56 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. p: 108-110.
- 57 Young GA. 1967.** Neumonía virógena porcina. En: Enfermedades del cerdo. 1ra Ed, Cap 6. Ed. H.W. Dunne. Ed. Union Tipográfica Editorial Hispano – Americana. México.
- 58 Young B, Dewey C, and Rosendal T. 2001.** Investigating the impact of immunity to *M. hyopneumoniae*, PRRSV and SIV on a farm with on – going nursery pig problems. Proceedings of the American Association of Swine Veterinarians annual meeting. Nashville. p: 31 – 35.

Apéndice I

Resultados de la Regresión de Cox, demuestra que ninguna de las variables (sexo y número de partos) influyen en el momento de la infección

	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp (B)	95 % de IC para Exp (B)	
							Lower	Upper
2^{do} parto			0.084	2	0.959			
3^{er} parto	0.048	0.595	0.007	1	0.935	1.050	0.327	3.370
4^{to} parto	0.180	0.681	0.070	1	0.791	1.198	0.315	4.547
Sexo	0.009	0.009	0.000	1	0.986	1.009	0.396	2.566

Apéndice II

Edad	Nacimiento		2 sem		4 sem		6 sem		8 sem	
	D.O	Result.	D.O	Result.	D.O	Result.	D.O	Result.	D.O	Result.
210	2.37	Positivo	1.47	Positivo	1.19	Positivo	0.84	Positivo	0.35	Positivo
212	2.48	Positivo	1.43	Positivo	1.19	Positivo	0.76	Positivo	0.36	Positivo
213	2.67	Positivo	1.43	Positivo	1.12	Positivo	0.74	Positivo	0.15	Negativo
214	2.46	Positivo	1.77	Positivo	1.48	Positivo	0.73	Positivo	0.31	Negativo
215	1.41	Positivo	1.78	Positivo	0.60	Positivo	0.23	Negativo	0.37	Negativo
216	1.26	Positivo	0.55	Positivo	0.40	Positivo	0.21	Negativo	0.11	Negativo
217	2.18	Positivo	1.43	Positivo	1.22	Positivo	0.64	Positivo	0.36	Positivo
219	2.08	Positivo	1.31	Positivo	1.41	Positivo	0.69	Positivo	0.40	Positivo
221	2.40	Positivo	1.73	Positivo	1.43	Positivo	0.85	Positivo	0.37	Positivo
223	1.99	Positivo	1.96	Positivo	1.27	Positivo	0.73	Positivo	0.43	Positivo
224	2.55	Positivo	1.78	Positivo	1.19	Positivo	0.65	Positivo	0.24	Negativo
225	2.07	Positivo	1.57	Positivo	1.29	Positivo	0.72	Positivo	0.31	Negativo
226	1.20	Positivo	0.71	Positivo	0.54	Positivo	0.33	Positivo	0.20	Negativo
227	1.85	Positivo	1.55	Positivo	1.24	Positivo	0.72	Positivo	0.37	Positivo
228	2.36	Positivo	1.61	Positivo	1.31	Positivo	0.70	Positivo	0.31	Positivo
229	1.59	Positivo	1.56	Positivo	1.56	Positivo	0.93	Positivo	0.46	Positivo
230	1.30	Positivo	0.75	Positivo	0.44	Positivo	0.24	Negativo	0.11	Negativo
232	1.14	Positivo	0.70	Positivo	0.60	Positivo	0.21	Negativo	0.14	Negativo
251	2.30	Positivo	1.65	Positivo	1.33	Positivo	1.07	Positivo	0.38	Positivo
252	2.59	Positivo	1.59	Positivo	1.04	Positivo	0.69	Positivo	0.30	Negativo
253	1.86	Positivo	1.54	Positivo	1.18	Positivo	0.67	Positivo	0.29	Negativo
254	2.38	Positivo	1.71	Positivo	1.27	Positivo	0.82	Positivo	0.35	Positivo
255	2.41	Positivo	1.75	Positivo	1.37	Positivo	0.71	Positivo	0.29	Negativo
256	2.25	Positivo	1.58	Positivo	1.36	Positivo	0.89	Positivo	0.32	Negativo
261	2.31	Positivo	1.62	Positivo	1.30	Positivo	0.73	Positivo	0.35	Positivo
263	0.55	Positivo	0.40	Positivo	0.39	Positivo	0.24	Negativo	0.16	Negativo
264	2.45	Positivo	1.59	Positivo	1.20	Positivo	0.65	Positivo	0.24	Negativo
265	1.94	Positivo	1.54	Positivo	1.13	Positivo	0.69	Positivo	0.26	Negativo
266	2.70	Positivo	1.88	Positivo	1.33	Positivo	0.78	Positivo	0.38	Positivo
267	0.71	Positivo	0.62	Positivo	0.44	Positivo	0.26	Negativo	0.19	Negativo

Apéndice II

(Continuación)

Edad	10 sem		12 sem		14 sem		16 sem		Diagnostico Final
	D.O	Result.	D.O	Result.	D.O	Result.	D.O	Result.	
210	0.11	Negativo	0.40	Positivo	0.16	Negativo	0.20	Negativo	Positivo
212	0.24	Negativo	0.21	Negativo	0.56	Positivo	0.71	Positivo	Positivo
213	0.18	Negativo	0.48	Positivo	0.45	Positivo	0.57	Positivo	Positivo
214	0.20	Negativo	0.31	Positivo	0.16	Negativo	0.18	Negativo	Positivo
215	0.22	Negativo	0.22	Negativo	0.13	Negativo	0.15	Negativo	Negativo
216	0.27	Negativo	0.17	Negativo	0.14	Negativo	0.17	Negativo	Negativo
217	0.23	Negativo	0.13	Negativo	0.25	Negativo	0.19	Negativo	Negativo
219	0.18	Negativo	0.25	Positivo	0.20	Negativo	0.25	Negativo	Positivo
221	0.19	Negativo	0.28	Positivo	0.22	Negativo	0.19	Negativo	Positivo
223	0.21	Negativo	0.29	Positivo	0.22	Negativo	0.15	Negativo	Positivo
224	0.26	Negativo	0.25	Positivo	0.23	Negativo	0.16	Negativo	Positivo
225	0.25	Negativo	0.22	Negativo	0.16	Negativo	0.16	Negativo	Negativo
226	0.26	Negativo	0.23	Negativo	0.53	Positivo	0.56	Positivo	Positivo
227	0.19	Negativo	0.17	Negativo	0.17	Negativo	0.16	Negativo	Negativo
228	0.29	Negativo	0.22	Negativo	0.16	Negativo	0.14	Negativo	Negativo
229	0.17	Negativo	0.27	Positivo	0.22	Negativo	0.14	Negativo	Positivo
230	0.20	Negativo	0.47	Positivo	0.68	Positivo	0.66	Positivo	Positivo
232	0.34	Positivo	0.12	Negativo	0.13	Negativo	0.13	Negativo	Positivo
251	0.14	Negativo	0.30	Positivo	0.21	Negativo	0.17	Negativo	Positivo
252	0.19	Negativo	0.24	Negativo	0.53	Positivo	0.73	Positivo	Positivo
253	0.27	Negativo	0.25	Negativo	0.22	Negativo	0.48	Positivo	Positivo
254	0.24	Negativo	0.26	Positivo	0.22	Negativo	0.14	Negativo	Positivo
255	0.20	Negativo	0.22	Negativo	0.15	Negativo	0.12	Negativo	Negativo
256	0.12	Negativo	0.22	Negativo	0.20	Negativo	0.14	Negativo	Negativo
261	0.30	Negativo	0.24	Negativo	0.14	Negativo	0.12	Negativo	Negativo
263	0.14	Negativo	0.15	Negativo	0.30	Positivo	0.61	Positivo	Positivo
264	0.30	Negativo	0.22	Negativo	0.26	Positivo	0.46	Positivo	Positivo
265	0.26	Negativo	0.19	Negativo	0.12	Negativo	0.56	Positivo	Positivo
266	0.21	Negativo	0.21	Negativo	0.16	Negativo	0.13	Negativo	Negativo
267	0.13	Negativo	0.18	Negativo	0.26	Positivo	0.31	Positivo	Positivo