

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Influencia de una bacterina de dosis única
contra *Mycoplasma hyopneumoniae* sobre
el título de anticuerpos y la ganancia de
peso de porcinos provenientes de madres
vacunadas**

TESIS Para optar el Título profesional de: MÉDICO VETERINARIO

AUTOR:

Pinto Jiménez, Chris Evelyn

LIMA – PERÚ 2005

Esta tesis se la dedico a:

A Dios, por haberme dado la vida, por cuidarme y darme la oportunidad de cumplir una de mis metas.

A mis Padres Iris y Fredy, por su apoyo incansable, por el esfuerzo realizado para hacer de mí una mejor persona y por enseñarme con su ejemplo como salir adelante, los amo mucho y les estaré eternamente agradecida.

A mi hermana Kathy, que siempre me apoyo cuando más lo necesite y por hacerme tía de unos sobrinos maravillosos Alvaro y Ariana.

A mi abuelita y mis tías que me brindaron su cariño y apoyo incondicionalmente.

A la Dra. Sonia Calle por su amistad, confianza, consejos, y por darme la oportunidad de realizar la presente tesis.

*A Paul, por sus palabras de aliento,
por desafiarme y retarme a cumplir
mis metas y sueños.*

*A mis amigos de la Universidad:
Fiorella, Vanessa, Roxana, Jannet,
Miryam, Roció, Diana, Renzo y
Marcos, con los que aprendí y compartí
momentos inolvidables.*

*A mis amigos de niñez y hermanos
de toda la vida Christian, Carlo Martín,
Carlos, Oscar, Juan, Moises, Beto,
Claudia, Marylin, Magaly, Kathy,
Selene, Karla y Diana; con los que crecí
y descubrí mi vocación por la ciencia.*

*A Marlon, y Miguel por brindarme su
amistad, asesoría y contribución en el
desarrollo de la presente tesis.*

*Un agradecimiento especial a los Drs.
Cesar Gavidia y Néstor Falcón, por sus
aportes al presente trabajo.*

TABLA DE CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
2.1 Antecedentes	3
2.2 Etiología	4
2.3 Epidemiología	7
2.3.1 Transmisión	9
2.3.2 Influencia en parámetros productivos	11
2.3.3 Complejo de Enfermedad Respiratoria Porcina	11
2.4 Signos clínicos y Lesiones	12
2.5 Inmunidad	15
2.5.1 Inmunidad Humoral	15
2.5.2 Inmunidad Celular	18
2.6 Fisiopatología	19
2.7 Diagnóstico	25
2.7.1 Pruebas de Laboratorio para la detección de antígenos	27
2.7.1.1 Anticuerpos Fluorescentes	27
2.7.1.2 Inmunohistoquímica	27
2.7.2 Pruebas de Laboratorio para la detección de anticuerpos	28
2.7.2.1 Inhibición de la Hemaglutinación (HI)	28
2.7.2.2 Inmunofluorescencia (IF)	28
2.7.2.3 Inmunoperoxidasa (IP)	28
2.7.2.4 Fijación del Complemento (FC)	29
2.7.2.5 Inmuno Ensayo Ligado a Enzimas (ELISA)	29
2.7.3 Pruebas de Laboratorio para la detección de ADN	30
2.7.3.1 Hibridización in situ	30
2.7.3.2 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	30
2.7.4 Diagnóstico diferencial	31
2.8 Tratamiento, Prevención, Control y Erradicación	32
2.8.1 Tratamiento	32
2.8.2 Prevención y Control	32

2.8.2.1 Vacunación	34
2.8.2.1.1 Vacunación a una dosis	37
2.8.2.1.2 Vacunación a dos dosis	38
2.8.3 Erradicación	39
III. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1 Lugar de estudio	41
3.2 Sistema de manejo en la granja	41
3.3 Animales y tamaño de muestra	42
3.4 Inmunización	43
3.5 Materiales usados durante el muestreo	43
3.6 Materiales y equipos usados en el Laboratorio	43
3.7 Recolección de muestras	44
3.8 Procesamiento de las muestras	44
3.8.1 <i>Procedimiento del análisis</i>	
3.8.1.1 Reactivos	44
3.8.1.2 Preparación de las muestras	45
3.8.1.3 Distribución e incubación de los controles y muestras en la placa	45
3.8.1.4 Adición e incubación del conjugado	45
3.8.1.5 Adición e incubación del sustrato	46
3.8.1.6 Adición de la solución de interrupción y calibración del lector	46
3.8.1.7 Lectura y cálculo de los resultados	46
3.8.1.8 Interpretación de resultados	47
3.9 Determinación de la ganancia de peso	47
3.10 Determinación del porcentaje de consolidación pulmonar	47
3.11 Análisis Estadístico	49
IV. RESULTADOS	50
V. DISCUSIÓN	56
VI. CONCLUSIONES	64
VII. RECOMENDACIONES	65
VIII. BIBLIOGRAFÍA CITADA	66
IX. APÉNDICE	82

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar si la inmunización con bacterina de dosis única contra *Mycoplasma hyopneumoniae* influye en los títulos de anticuerpos, ganancia de peso, y lesiones pulmonares en porcinos de crianza intensiva. Se emplearon 60 porcinos provenientes de madres vacunadas, los cuales fueron divididos en 2 grupos de 30 lechones cada uno (15 hembras y 15 machos), un grupo fue inmunizado a los 42 días de edad y el otro fue utilizado como control. Se tomaron muestras de sangre a los 21, 42, 70, 84, 112, 145 días de edad, midiéndose el título de anticuerpos con la prueba de ELISA indirecta. Los pesos se tomaron a los 21 y 145 días de edad y las lesiones pulmonares se evaluaron al beneficio. Alrededor del 60%(18/30) de porcinos en ambos grupos presentaron altos títulos de anticuerpos a los 21 días de edad; disminuyendo hacia los 70 días. El grupo inmunizado elevó sus títulos entre los 84 y 145 días de edad y el grupo control elevó sus títulos hacia los 112 días de edad. No existió diferencia estadística significativa en la ganancia de peso de ambos grupos. El 79.31%(23/29) y 20.69%(6/29) del grupo control e inmunizado respectivamente presentaron lesiones pulmonares al beneficio. Se puede concluir, que la inmunización con bacterina de dosis única contra *M. hyopneumoniae* elevó los títulos de anticuerpos de los porcinos inmunizados, aunque no en toda la población, disminuye el porcentaje de lesiones pulmonares al beneficio, pero no influyó en la ganancia de peso.

Palabras clave: porcinos, *Mycoplasma hyopneumoniae*, bacterina de dosis única, título de anticuerpos, ganancia de peso.

ABSTRACT

The aim of the present study was done to determinate if the immunization with single dose commercial bacterin against *Mycoplasma hyopneumoniae* will influence in the antibody titles, weight gain, and pulmonary lesions in a swine intensive rearing system. Sixty piglets which proceeded from vaccinated sows were used. One group of 30 piglets (15 males and 15 females) were vaccinated at 42 days of age and the other group of 30 piglets remain unvaccinated, and they were used as a control group. Blood samples were obtained at 21, 42, 70, 84, 112 and 145 days of age. The antibodies titles were measured with an indirect assay of ELISA. The weight was measured at the 21 and 145 days of age. The pulmonary lesions were evaluated at slaughter. Around the 60%(18/30) of pigs from both groups revealed high antibody titles at 21 days of age, but these titles diminished at 70 days. The vaccinated group elevated their titles between the 84 and 145 days of age while the unvaccinated group elevated their antibodies titles at 112 days of age. There were no significant differences in the weight gain between both groups. The 79,31%(23/29) and 20,69%(6/29) from the control group and the vaccinated group, respectively, presented pulmonary lesions at the slaughter. The results demonstrate that the vaccination with single dose bacterin against *Mycoplasma hyopneumoniae* increase the antibody titles, although not in all population, diminish the percentage of pulmonary lesions, but no influence in the weight gain.

Key words: *Mycoplasma hyopneumoniae*, pigs, one dose bacterin, antibody titles, weight gain.

LISTA DE TABLAS Y GRÁFICOS

- Tabla N° 1: Puntuación según la extensión de la lesión de consolidación pulmonar en cada lóbulo. Pág. 48.
- Tabla N° 2: Área de consolidación de lóbulos pulmonares, considerándose el área consolidada y el peso relativo del lóbulo en relación al parénquima pulmonar. Pág. 48.
- Tabla N° 3. Puntuación relativa a las categorías de volumen de consolidación pulmonar. Pág. 49.
- Tabla N° 4. Resultados del Análisis de Varianza para la ganancia de Peso Pág. 53.
- Tabla N° 5. Promedio de ganancia de peso de los porcinos (Kg. Peso vivo). Pág. 53.
- Tabla N° 6. Total de porcinos en categorías (1, 2, 3 y 4) con porcentaje de Consolidación Pulmonar, mediante Chi Cuadrado. Pág. 55.
- Gráfico N° 1. Porcentaje de animales seropositivos a *Mycoplasma hyopneumoniae* por la prueba de ELISA durante los seis muestreos realizados, para ambos grupos. Pág. 52.
- Gráfico N° 2. Títulos de anticuerpos por la prueba de ELISA durante los seis muestreos realizados, para ambos grupos. Pág. 52.
- Gráfico N° 3. Porcentaje de porcinos en alguna categoría de Consolidación Pulmonar por grupo. Pág. 55.

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente la industria porcina enfrenta una serie de retos y cambios en su estructura en búsqueda del mejoramiento productivo, cumpliendo así con las exigencias del mercado; esto ha llevado a los productores a crear sistemas de producción que disminuyan las posibilidades de infección con diversos microorganismos dentro de las granjas, además de identificar los factores que influyen en la presentación de las enfermedades, tales como los ambientales, genéticos y de espacio; siendo este último el más importante a tomar en cuenta en la presentación de enfermedades de tipo respiratorio. El aire se carga rápidamente de partículas, entre ellas microorganismos, facilitando su difusión a toda la granja, además, el contacto directo entre los animales es cada vez más íntimo; manejando estos factores, minimizaremos las pérdidas ocasionadas por la introducción de nuevos patógenos a las granjas.

Entre los patógenos comúnmente conocidos que residen en el tracto respiratorio, *Mycoplasma hyopneumoniae* es el agente causal de un cuadro neumónico denominado Neumonía Micoplásmica (NM), siendo esta de gran importancia (Ross, 2000). Este agente produce grandes pérdidas económicas en la industria porcina alrededor del mundo, al afectar los parámetros productivos de los cerdos de engorde, disminuyendo el promedio de ganancia diario y la eficiencia de conversión (Morrison, 1984) produciendo desuniformidad y prolongando los días de salida al mercado, reduciendo aún más el rendimiento (Valdivia, 1999).

Este agente ha sido también implicado como parte importante de un Complejo infeccioso, donde intervienen diversos patógenos de las vías respiratorias, el Complejo Respiratorio Porcino (CERP), donde *Mycoplasma hyopneumoniae* actúa

como agente primario (Piffer y Ross, 1984; Ross, 1999); predisponiendo a los porcinos a infecciones secundarias como la producida por *Actinobacillus pleuroneumoniae* (Ciprian *et al.*, 1988; Yagihashi *et al.*, 1984), *Haemophilus parasuis* y frecuentemente *Pasteurella multocida* (Morrison *et al.*, 1985; Amass *et al.*, 1994); además de diversos virus, entre los que se encuentran el virus del Síndrome Respiratorio Reproductivo Porcino (SRRP) (Thacker E *et al.*, 1999b), Influenza Porcina (IP) y circovirus tipo 2.

Un diagnóstico rápido de la presencia de este agente es útil para establecer medidas de control adecuadas, una herramienta con la que se cuenta actualmente es la serología; con métodos rápidos y precisos que pueden ser aplicados a toda una población. Ésta nos brinda información sobre el momento de seroconversión del animal, así como, el título de anticuerpos presentes en la muestra, además de establecer el comportamiento de los anticuerpos en un periodo productivo. Así mismo, permite evaluar las estrategias de vacunación utilizadas y la eficacia de los sistemas de manejo (Clark, 1999; Moore *et al.*, 1997).

En la producción porcina, la inmunización contra *Mycoplasma hyopneumoniae* es uno de los métodos recientemente implementados, la misma que se realiza con bacterinas de dos dosis; el inconveniente de este tipo de vacunas es la manipulación de los animales en dos oportunidades para lograr una inmunización efectiva, por ello, es necesario el estudio sobre la inmunización con bacterina de dosis única, para determinar si es tan eficiente en la prevención de los efectos negativos de la enfermedad al igual que la de dos dosis; lo cual disminuiría la manipulación de los animales, además de la mano de obra necesaria para esta labor.

El objetivo del presente trabajo fue determinar mediante el uso de la serología y de los parámetros productivos, si la inmunización con bacterina de dosis única de *M. hyopneumoniae* influye positivamente en el título de anticuerpos y la ganancia de peso de porcinos provenientes de madres vacunadas. Los resultados de este estudio permitirán establecer pautas sobre el manejo de las inmunizaciones en las distintas granjas según sus condiciones, obteniendo éstas, un beneficio económico por la reducción de gastos en vacunación y por la reducción de los daños causados a nivel respiratorio por la infección con *M. hyopneumoniae* en los porcinos.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Antecedentes

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).

Esta enfermedad era considerada anteriormente como una Pasteurelisis, siendo descartada en 1907 por Huytra; 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; esto fue desestimado por Pullar en 1948, quien caracterizó la neumonía como "crónica" (Stipkovits, 1995; Ross, 1986; Plonart y Bickhardt, 2001).

Desde su aparición, la enfermedad tuvo varias denominaciones, tales como: Fergelgrippe (Köbe, 1933), Neumonía Infecciosa del cerdo (Pullar, 1948; Gulrajani y Beveridge, 1951), Neumonía Virógena Porcina (Betts, 1952), Tos Infecciosa del cerdo (Rislakki, 1953), Neumonía Virógena Enzoótica (Hjärre *et al.*, 1952) y Neumonía Enzoótica del cerdo (Wesslén y Lannek, 1954)

La denominación de Neumonía Enzoótica, nombre con el que se conoce mundialmente a esta enfermedad, ha quedado obsoleta y en la actualidad la enfermedad es conocida como “Neumonía Micoplásmica” (NM) y está ampliamente distribuida a nivel mundial en las pjaras causando grandes pérdidas económicas.

2.2 Etiología

Los micoplasmas son organismos procariotas, se reproducen por fisión binaria y taxonómicamente pertenecen a la Clase de los *Mollicutes*, orden *Mycoplasmatales* y Familia *Mycoplasmataceae*. Recientemente los micoplasmas se han incluido en la sección XXI (*Mollicutes*) del volumen 3 (bacterias grampositivas con bajo contenido en G+C), de la 2ª edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Poveda *et al*, 2002).

Los micoplasmas constituyen un grupo coherente de microorganismos relacionados con bacterias grampositivas, pero que en el curso de la evolución y después de una serie de mutaciones y adaptaciones perdieron la capacidad de sintetizar la pared celular; esto se debe a que son incapaces de sintetizar peptidoglicano. Al carecer de pared bacteriana son gramnegativos y se tiñen mal con otros colorantes; como resultado de esta característica su morfología es extremadamente variable siendo pleomórficos, adoptando formas que varían desde esférica a ovoide o piriforme, e incluso helicoidal (Poveda *et al*, 2002).

M. hyopneumoniae tiene un diámetro medio de 0,2 μ m, y está rodeado por una membrana simple de unos 10 nm de grosor. Posee una membrana plasmática trilaminar, citoplasma con ribosomas, gránulos citoplasmáticos y un núcleo constituido por moléculas bicatenarias de ADN y ARN (Andrada *et al*, 2001). A diferencia de las membranas bacterianas, la membrana de los *Mollicutes* contiene colesterol; y en su mayoría contienen fosfolípidos y glucoproteínas, que junto con las proteínas constituyen los determinantes antigénicos más importantes (Poveda *et al*, 2002).

En la superficie externa de la membrana plasmática se aprecia una especie de cápsula, de naturaleza polisacárida. Mediante diversas pruebas químicas se revela ultraestructuralmente una capa compacta, compuesta por proteínas, entre la

membrana plasmática y otra capa más externa, compuesta por carbohidratos. Estas proteínas confieren al micoplasma una porción hidrófoba mínima que favorece la adherencia a las células respiratorias mediante interacciones hidrofóbicas (Andrada *et al*, 2002).

El contacto estrecho entre los micoplasmas y su célula hospedera es necesario, para conseguir los nutrientes y factores de crecimiento, en especial los precursores de ácidos nucleicos que son incapaces de sintetizar (Wolfgang *et al*, 1997).

Es un microorganismo de difícil cultivo, en la actualidad, se emplea para su aislamiento el medio de Friis modificado, introducido por Friis (1971) y modificado por Ross y Whittlestone (1983), por la adición de 8,1 % de suero porcino para mejor adaptación del micoplasma al cultivo (Ross, 2000; Andrada *et al*, 2002; Thacker E, 2001). Por lo general, los cultivos se pasan varias veces en caldo y luego se inoculan en medio sólidos y se incuban en una atmósfera de 5 -10% de dióxido de carbono.

En cultivos primarios en caldo, *M. hyopneumoniae* crece lentamente y produce una leve turbidez y un cambio de color al ácido después de 3 -30 días de incubación. Las colonias se hacen visibles de 2-3 días de incubación y aumentan de tamaño hasta aproximadamente 0.25–1mm de diámetro alrededor de los 10 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 ligera 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 el trifosfato de adenosina (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*, 2002).

Debido a que *M. hyorhinis* puede encontrarse de forma habitual en el tracto respiratorio del cerdo, se recomienda la adición de un antisuero frente a este

microorganismo al cultivo, ya que éste es de fácil crecimiento y frente al que *M. hyopneumoniae* es muy mal competidor.

En 1996, Artiushin y Minion demostraron utilizando técnicas de inhibición del crecimiento y de biología molecular, que existen cepas heterógenas, debido a su marcada propensión para cambiar los antígenos de superficie lo que dificulta el aislamiento y su ocasional identificación (Andrada *et al*, 2002 y Ross, 2000).

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 especie específicos de *M. hyopneumoniae* no encontradas en otros micoplasmas comunes en los cerdos (Caron *et al*, 2000b).

Existen cepas patógenas y no patógenas de *M. hyopneumoniae*, siendo genéticamente diversas en la naturaleza, dividiéndose en 6 subgrupos epidemiológicos (Halbur, 1997); aunque según Thacker (2000) este agente no se clasifica por cepas, ya que carece de marcadores para diferenciarlos; sin embargo, existe variación antigénica entre estos (Desroisiers, 2001). Posee similitudes antigénicas con *Mycoplasma flocculare*, así como, morfológicas y de cultivo, aunque éste no es normalmente un patógeno reconocido del cerdo. Para diferenciarlos hay que efectuar pruebas serológicas, basadas en el estudio de antígenos específicos (proteína lactato deshidrogenasa 36 kDa, 40, 43, 64, 74 y 97 kDa) de *M. hyopneumoniae* (Andrada *et al*, 2002).

2.3 Epidemiología

Mycoplasma hyopneumoniae es un microorganismo difundido ampliamente en la naturaleza, se encuentra en las granjas porcinas alrededor del mundo. Se adhiere a la mucosa traqueal y bronquial y causa una pérdida extensa de cilios; permanece sin ser eliminado por los movimientos mucociliares y sin estimular una respuesta inmune que pueda removerlo (Janke, 1997); el grado de las lesiones que produce puede depender de otros factores como otras bacterias, virus y parásitos.

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*, 2002).

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 cerdos jóvenes (Done, 1997).

Se sugiere que todos los grupos etéreos 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, 2000).

El curso frecuentemente subclínico en una explotación puede deberse a la escasa inmunidad en la 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*, 2002).

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).

Por otro lado, el hecho de que los animales no sean de una raza determinada influye también en la menor presentación de la enfermedad. Al respecto Gardner y Hird, (1990) al hacer un estudio sobre los factores determinantes de neumonía en cerdos beneficiados, indicó que la heterosis ofrecía protección contra la presentación de neumonía.

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, 1999a). 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 pjaras están afectadas con neumonía micoplásmica; variando la prevalencia entre 38 a 100% en diferentes países. Young (1983) encontró que un 60% de animales de diferentes pjaras presentaban anticuerpos fijadores del complemento (FC), en especial en cerdos cerca al beneficio.

En un trabajo previo realizado en mataderos de nuestro país, se obtuvo una prevalencia de lesiones del 40% en animales que procedían de explotaciones intensivas (Vega, 1969); además, Huallanca (1999), utilizó la prueba de ELISA para determinar cerdos seroreactores a *M. hyopneumoniae* procedentes de granjas tecnificadas del valle de Lima, encontrando una frecuencia de 12.2%. Anteriormente en el Perú no se había logrado demostrar la presencia de este microorganismo, a pesar de la importancia de esta enfermedad.

Según Rautiainen (2001) la prevalencia de lesiones neumónicas es mayor en los cerdos que seroconvierten tardíamente; por otro lado la extensión de las lesiones pulmonares tiende a ser mayor en los cerdos que seroconvierten tempranamente en el periodo de crianza.

2.3.1 Transmisión

Su transmisión es principalmente por contacto nasal (Done, 1997); también se han propuesto otras vías de transmisión, como fómites (Goodwin, 1984) y vía aerógena (Goodwin 1985, Thomsen *et al.*, 1992), pero ninguna de estas dos últimas vías había sido demostrada experimentalmente; pero, Stärk y col (1998) 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 libre de *Mycoplasma hyopneumoniae* (Stärk *et al.*, 1998).

La propagación de *M. hyopneumoniae* de una granja a otra es más probable cuando hay poca distancia entre granjas, cuando la zona es de alta densidad porcina y cuando hay distancias cortas de la explotación a rutas de alto tráfico de porcino (Andrada *et al.*, 2002). La transmisión entre granjas a cargo del personal, no debe ser de mayor de preocupación si se toman las medidas adecuadas de ducha y cambio de ropa (Pijoan, 2002).

Aparentemente son tres los 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. 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; la excreción de micoplasmas por hembras primíparas es atribuible a la baja inmunidad contra el agente, de estas cerdas (Andrada *et al.*, 2002)

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 diario y la eficiencia de conversión (Morrison, 1984) 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 y Calle, 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 Complejo de Enfermedad Respiratoria Porcina

El complejo respiratorio porcino (CERP) es un desorden respiratorio económicamente significativo (E. Thacker, 1999a), caracterizado por crecimiento lento, disminución de la eficiencia alimenticia, letargia, anorexia, fiebre, tos y disnea (Halbur, 1998). Aunque este complejo en cerdos se debe a la combinación

de varios agentes, *M. hyopneumoniae* es considerado el más importante (Zhang *et al.*, 1995).

El daño causado en el epitelio de las vías aéreas es uno de los factores que potencia la infección mixta comúnmente vista en CERP (DeBey y Ross, 1994). Bajo condiciones de campo, el daño en el aparato mucociliar y el epitelio de las vías aéreas conlleva al incremento de las infecciones bacterianas y virales secundarias. El 70% de los porcinos son afectados por este complejo y entre un 4 a 65% aproximadamente muere (Clark, 1999).

La infección respiratoria mixta está típicamente asociada con el Síndrome Respiratorio Reproductivo Porcino (SRRP), Influenza porcina, *Pasterurella multocida*, *Actinobacillus pleuroneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, y menos frecuentemente estreptococos y staphylococcus (Halbur, 1998; Maes, 1996).

Los estudios sugieren que la influencia del micoplasma en las neumonías virales de los cerdos varía con el agente viral infectante, es así que la interacción entre el virus de la Influenza Porcina es distinta a la interacción entre el micoplasma y el virus del SRRP (E. Thacker *et al.*, 2001).

El efecto causado por la interacción entre *M. hyopneumoniae* y el virus de la Influenza Porcina es aditivo y transitorio en la naturaleza, con una interacción mínima entre estos dos agentes, debido a que la coinfección de un animal con micoplasma no altera significativamente el curso de la enfermedad causada por el virus de la Influenza Porcina (E. Thacker *et al.*, 2001).

El virus del SRRP infecta células del sistema macrófago/monocito, y *M. hyopneumoniae* induce la infiltración de macrófagos y linfocitos en el parénquima pulmonar, manteniendo un suministro constante de células blanco al virus del PRRS, potenciando así la neumonía causada por este virus (E. Thacker *et al.*, 1999b).

2.4 Signos clínicos y Lesiones

Los signos clínicos de la enfermedad fueron caracterizados por Betts (1952), y muchos investigadores han concurrido después con su descripción de la enfermedad (Ross, 1973). 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.*, 2002). 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 líquido de edema eosinófilo y grandes cantidades de células mononucleares, septales y polimorfonucleares. A los 15–20 días hay formación de manguitos apreciable o hiperplasia linfoide alrededor de las vías aéreas, acumulaciones más extensas de líquido de edema, grandes células mononucleares y otras células inflamatorias en los alvéolos y engrosamiento de los tabiques interalveolares. 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 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, 1999).

M. hyopneumoniae posee vellosidades en su capa externa y una cápsula en la superficie que lo protegen de la 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 (E. 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 (E. 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 (E. Thacker, 2001), teniendo un mínimo o nulo impacto en el nivel de infección (B. Thacker y E. Thacker, 2001).

Durante la gestación, los anticuerpos protectivos son transferidos de la sangre a la ubre durante el último mes (Wallgren 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, 1999).

Los anticuerpos colostrales 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, 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).

En hatos positivos a *Mycoplasma hyopneumoniae* las hembras transmitirán anticuerpos maternos a su descendencia vía calostro, los cuales bajo circunstancias normales decrecerán gradualmente hacia las seis semanas de edad (Thacker, 1997).

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

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 (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 (E. 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) en un estudio demostró, 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 más 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 (E. Thacker, 1999a). Además, estos niveles séricos postvacunales, no se correlaciona con un alto grado de protección, ni con una mayor duración de la misma; incluso varía de uno a otro individuo (Suprenant, 2001).

2.5.2 Inmunidad celular

Mycoplasma hyopneumoniae incrementa el nivel de citoquinas proinflamatorias (macrófagos), como las IL-1(á y â), IL-6 que inducen una inflamación más amplia y daño tisular (Thacker *et al.*, 1999a). Aparentemente esto se relaciona con el aumento de calcio producto de la infección de las células epiteliales ciliadas (E. 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 (E. 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 (E. 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 γ , 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- α) en los fluidos bronquioalveolares, así como de la producción de Interferón gamma (IFN- γ) específico a *M. hyopneumoniae* (E. Thacker *et al*, 2000).

Se ha comprobado que los porcinos expuestos y no inmunizados presentan una mayor concentración de TNF- α en el fluido bronquioalveolar, en comparación con los animales expuestos e inmunizados (B. Thacker y E. 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

Las superficies mucosas son la principal vía de entrada y el principal sitio de infección de muchos agentes infecciosos; entre ellos *Mycoplasma hyopneumoniae*. El punto central sobre el que se orientan la mayoría de los estudios de la patogenia de esta enfermedad es la interacción entre el micoplasma y la membrana citoplasmática de las células epiteliales de las vías respiratorias (Andrada *et al.*, 2002).

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

Estudios realizados usando hibridación 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.*, 2002).

El periodo de incubación es en promedio de 10–16 días en condiciones naturales, sin embargo, se han 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 los 10 días después de la infección (Andrada *et al.*, 2002). 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 (E. 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 el que determina la patogenicidad de las diferentes cepas de *M. hyopneumoniae* (Andrada *et al* 2002).

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 *et al.*, 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^+ 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 Mnion, 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 burla 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 α ; induce además la formación de quimioquinas como, la proteína 1-quimioatrayente de monocitos (MCP-1), proteína 1 inflamatoria de macrófago (MIP-1 α), 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, 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 (E. 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, 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, 2000).

En un estudio in vitro, realizado por Zielinsky y Ross demostraron que alguna 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.*, 2002).

La patogénesis de la neumonía micoplásmica 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 (E. 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 dificultoso, sin embargo, si el cultivo se realiza correctamente, sigue siendo el mejor método para detectar la enfermedad (E. 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 estas proteínas 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 o acholeplasma; 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 Pruebas de Laboratorio para la 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; pudiendo utilizar tejido pulmonar congelado (E. Thacker, 2001). Los mejores resultados se obtiene 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, 1997).

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; E. Thacker, 2001).

2.7.2 Pruebas de Laboratorio para la 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.*, 2002).

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 la presencia del micoplasma 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.*, 2002).

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.*, 2002).

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.*, 2002).

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 ELISA 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).

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 seroreactivos a *M. hyopneumoniae* procedentes de granjas tecnificadas del valle de Lima.

2.7.3 Pruebas de Laboratorio para la 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 escobillones 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 (E. 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 técnicas de PCR 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).

2.7.4 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*.

2.8 Tratamiento, Prevención, Control y Erradicación

2.8.1 Tratamiento

Se han recomendado diversos medicamentos para contrarrestar los efectos de la bacteria en las granjas porcinas, para ello se disponen de una variedad de antibióticos en el mercado; entre los cuales encontramos a Valnemulina (Hannan *et al.*, 1997), Tiamulina y Enrofloxacin (Friis y Szancer, 1994; Hannan *et al.*, 1997) que han mostrado ser los más potentes antimicrobianos contra *M. hyopneumoniae*. En adición, Lincomicina, Tetraciclina y Tilosina son hábiles en inhibir el crecimiento del agente in vitro (Friis y Szancer, 1994).

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.

Debido a que *M. hyopneumoniae* no penetra el tejido bronquial, es difícil para los antibióticos alcanzar concentraciones eficaces en los sitios donde este localizado el micoplasma (Pijoan, 2001).

2.8.2 Prevención y Control

Las estrategias de control de la neumonía micoplásmica difieren con los diferentes sistemas usados en una granja, siendo la principal herramienta para manejar esta enfermedad la prevención basada en la medicación profiláctica y la vacunación (Stärk *et al.*, 1992).

En caso de sistemas de flujo continuo, una prueba serológica a un grupo de cerdos 2 semanas después de que ellos empiezan a toser ayudará en el diagnóstico de problemas respiratorios; si saliera positiva y los cerdos están creciendo lentamente, el uso continuo de vacunas a los cerdos no menores de 3 semanas debe controlar el problema (Clark, 2000).

Para cerdos con sistemas "todo dentro todo fuera" que desarrollan neumonía más allá de un mes antes de la matanza, una muestra serológica de cerdos tosiendo ayudará el diagnóstico; sin embargo se deberá valorar la proporción de crecimiento de los cerdos antes de una decisión para vacunarlos. Podría considerarse que la vacunación de cerdas controla los efectos de la neumonía en sistemas de manejo "todo dentro, todo fuera" (Clark, 2000).

En general las estrategias de control, sobretodo para enfermedades respiratorias comprenden:

- Destete Temprano segregado y producción en múltiples fases: está basado en separar y especializar las fases de la producción, interrumpiendo el ciclo de los patógenos y disminuir la contaminación, obteniéndose animales libres de enfermedad.

Los sistemas tradicionales son; "producción en un sitio" (1 Sitio) o ciclo cerrado y "producción en dos sitios" (2 Sitios) o ciclo abierto. La introducción del sistema "producción en tres sitios o múltiples fases" (3 Sitios) aporta una serie de ventajas sobre los métodos tradicionales, ya que, diferencia tres fases de la producción separadas completamente; sin embargo se deben seguir ciertos requisitos como un estricto "todo dentro-todo fuera", flujo de animales siempre del sitio 1 al 2, y de éste al 3, sin retornos hacia atrás; y las mezclas de distintos orígenes se harán solo en el sitio 2 (Andrada *et al.*, 2002). El destete temprano segregado ha tenido razonable éxito minimizando los niveles de infección en los cerdos. La repoblación de granjas con cerdos libres de *M. hyopneumoniae* no se usa ampliamente, debido a que es costoso (Stärk *et al.*, 1992).

- Estableciendo tratamientos con antibióticos de elección, los antibióticos que con más frecuencia se utilizan para controlar la Neumonía Micoplásmica son tetraciclina, tilosina, lincomicina, tiamulina, espiramicina, quinolonas (enrofloxacina, danofloxacina, norfloxacina). El empleo de antibióticos en el

control de la Neumonía Micoplásmica ha tenido éxitos variables en el control de pérdidas económicas. Hay varios sistemas de trabajo; como la medicación continua (aplicado en el pienso a dosis bajas), medicación pulsátil (aplicación de forma intermitente en niveles terapéuticos de antibióticos), y medicación estratégica (aplicación de dosis altas, durante un periodo corto de tiempo) (Andrada *et al.*, 2002).

2.8.2.1 Vacunación

Hay disponibles comercialmente diversas vacunas para prevenir la infección por *Mycoplasma hyopneumoniae*, la mayoría de vacunas son hechas a base de cultivos celulares inactivos y algunas vacunas moleculares han sido también probadas; la mayoría son de aplicación parenteral y se componen de organismos completos o extractos de ellos, combinados con hidróxido de aluminio (Andrada *et al.*, 2002).

La vacunación es el método de prevención más importante, por ello se deben utilizar bacterinas que contengan un adyuvante adecuado a fin de estimular una sólida inmunidad celular, humoral y local (Camacho y Calle, 2003). Recientes estudios se han centrado en entender el efecto de los adyuvantes en varios aspectos de la respuesta inmune. Se conoce el efecto de los adyuvantes de aumentar la inmunogenicidad de los antígenos vacunales e inducir la maduración de anticuerpos (Djordjevic *et al.*, 1997).

La vacunación no previene la colonización de los micoplasmas, ni impide la infección, sólo disminuye los signos clínicos y las lesiones neumónicas (Pijoan, 2001). Estas pueden reducir la enfermedad clínica, pero no disminuyen significativamente el número de microorganismos presentes en el tracto respiratorio (E. Thacker, 1999a).

Recientes estudios clínicos con vacunas modernas contra *M. hyopneumoniae* confirmaron que el control de este agente es beneficioso y mejora la ganancia diaria de peso (Baekbo, 2000).

En pruebas controladas todas las vacunas comerciales han demostrado que reducen el número y la extensión de las lesiones en un 50% y mejoran la ganancia

diaria de peso y el índice de conversión. También han demostrado reducir los tratamientos antibióticos (Andrada *et al.*, 2002).

La vacunación induce una respuesta inmune local, celular y humoral contra el agente en el tracto respiratorio de los cerdos, reduce el porcentaje de lesiones en la superficie pulmonar sugiriendo que los anticuerpos en mucosas, la mediación de la respuesta inflamatoria, y las respuestas inmunes transmitidas por las células son importantes para el control de la neumonía micoplasmal en cerdos; además estimula la producción de IFN- γ específicos a *M. hyopneumoniae* por linfocitos en la sangre; además la producción de TNF- α es menor en los animales vacunados comparados con los no vacunados (Thacker *et al.*, 2000).

Las bacterinas también pueden estimular la respuesta inmune mediada por células, ya que los adjuvantes que contienen, pueden favorecer la respuesta inmune al incrementar la superficie de absorción y aumentar los sitios de unión con el antígeno (Dayalu *et al.*, 1997).

Los factores que tienen influencia sobre la eficacia de la vacunación frente a *M. hyopneumoniae* son: el momento de la infección, la presión de infección, los anticuerpos maternos y la duración de la inmunidad deseada (Van Nes *et al.*, 2000).

Existe controversia sobre la edad en la cual los lechones se deben vacunar, lo ideal sería aplicar la vacuna a los lechones antes del momento de infección y previamente a la desaparición de la inmunidad proporcionada por el calostro, para esto es necesario hacer un diagnóstico que nos permita saber cuál es la situación en cada granja (Calle *et al.*, 2003).

La eficacia de la vacunación resultará reducida por los anticuerpos maternos si ésta, se realiza entre las 2 y 4 semanas de edad, o cuando hay niveles elevados de anticuerpos (B. Thacker *et al.*, 1998); en cambio, si se realiza entre las 4 y 6 semanas de edad no interferirá con la respuesta inmune inducida por la vacunación (E. Thacker, 2001). Corroborándose esto, con lo indicado por otros investigadores, donde la vacunación realizada unas semanas más tarde puede mejorar la eficacia de la vacuna, posiblemente debido a un menor impacto de los anticuerpos maternos en los lechones. La influencia de los anticuerpos

maternales puede variar entre las distintas granjas (Jensen *et al.*, 2000; Pommier *et al.*, 2000; Thacker *et al.*, 2000).

La vacunación entre 9–10 semanas de edad o al final de la etapa de cría, puede disminuir el nivel de anticuerpos vacunales y maximizar el efecto de la vacuna (Yeske, 2001).

En un estudio realizado en una granja porcina tecnificada del departamento de Lima, se encontró que los anticuerpos transmitidos por las madres no vacunadas y expuestas naturalmente descienden con mayor rapidez, que los transmitidos por las madres vacunadas, quedando expuestas las crías a infecciones naturales. Además, el sexo no ejerce ningún efecto sobre la persistencia de anticuerpos, más si, la condición inmunológica de la madre (Calle *et al.*, 2003)

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 (Pijoan, 2002) 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).

En la mayoría de las granjas porcinas de Perú no vacunaban contra *M. hyopneumoniae*, principalmente por que la vacuna ha sido recientemente desarrollada. Sin embargo, en un estudio realizado en Lima se encontró, que se obtiene un beneficio económico de \$ 3.00 por cerdo (Valdivia, 1999). Dayalú (1990) señaló que animales no vacunados demoran 13 días más para llegar al mercado encareciendo el producto en \$7.02 por cerdo.

Otra ventaja de la vacunación contra este agente es que ésta, disminuye la potenciación de la neumonía causada por PRRS en cerdos desafiados con ambos agentes (E. Thacker *et al.*, 1999a).

En el mercado existen vacunas contra *M. hyopneumoniae*, y en su mayoría son vacunas de dos dosis, sin embargo, recientemente se han desarrollado vacunas de dosis única, las que ofrecen protección al igual que las vacunas de dos dosis Es así como, la vacunación de los cerdos durante la etapa de crecimiento produce una respuesta sólida, especialmente con las vacunas de dos dosis, aunque la

vacunación a una dosis produce títulos de anticuerpos similares a las de dos dosis, pero la seroconversión es más tardía (Pijoan, 2002).

Existen vacunas autógenas, las que están hechas a base de microorganismos extraídos de pulmones neumónicos de un hato en particular, para luego elaborar una autovacuna. La eficacia y necesidad de vacunas autógenas es aun cuestionable, ya que, no siempre se puede asegurar que el cultivo obtenido para elaborar la vacuna sea puro, es decir, sin estar contaminado con *M. hyorinis* que es lo que comúnmente sucede, es así que la presencia de *M. hyorinis* en la vacuna puede hacernos dudar de la real masa antigénica de *M. hyopneumoniae* en la misma (E. Thacker, 2000).

Se ha ensayado el uso de vacunas vivas lapinizadas, aplicadas en aerosol, orales intraperitoneales y adyuvantadas en diluyente oleoso (Andrada *et al.*, 2002). 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 esta 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).

2.8.2.1.1 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 postvacunación, 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).

2.8.2.1.2 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 (E. Thacker, 1999b)

2.8.3 Erradicación

La erradicación de *M. hyopneumoniae* se ha iniciado en varios países; Dinamarca, Reino Unido y Suiza tienen unidades de cerdos libres de *M. hyopneumoniae*. Éste es, a menudo, el primer microorganismo en infectar estas unidades, ya que es difícil detener la transmisión por aerosol (Andrada *et al.*, 2002).

Se sugiere que la erradicación de este patógeno depende de dos factores: de la presencia de anticuerpos contra este agente en el suero porcino y del incremento en la inmunidad mediada por células en la infección por micoplasma (Thacker *et al.*, 2000).

Actualmente para eliminar el *M. hyopneumoniae* de las granjas se pueden usar cualquiera de estas 2 técnicas:

- Destete Temprano Segregado: numerosos trabajos mostraron que destetando a los lechones tempranamente (5 días de edad), estos no se infectaban, y podían ser criados aisladamente como si fueran animales libres de *M. hyopneumoniae*. Aunque esto sólo es útil en el establecimiento de nuevos lotes, no pudiendo usarse para lotes ya existentes (Plomgaard *et al.*, 1992). Pudiendo potenciarse si se le administra a las madres una medicación profiláctica antes y después del parto, además de seguir administrando antibióticos a las crías (Andrada *et al.*, 2002)
- Despoblación de animales jóvenes: recientes estudios en Europa, han mostrado que es posible eliminar el *M. hyopneumoniae* usando un protocolo que consiste en eliminar todos los animales menores de 10 meses de edad de la granja. Esto se sigue por un periodo de 2 semanas en la parición y tratando a las cerdas restantes con antibióticos micoplasmicidas. Esta técnica ha demostrado ser exitosa sobre todo en granjas pequeñas con sistemas de producción en un solo sitio (Baekbo *et al.*, 1994)

Aunque estas técnicas han demostrado tener sus desventajas, ya que, no pueden usarse en granjas existentes, pudiendo usarse sólo en granjas relativamente pequeñas. Además, no se pudo demostrar que el agente se ha eliminado realmente o si los animales son negativos sólo a las lesiones y seroconversión (Pijoan, 2001).

Existen otros métodos usados para erradicar este agente en granjas ya establecidas son:

- Histerectomía y aislamiento: Obtención de lechones por histerectomía y se crían separados de la madre, aislados en otro lugar distinto. El lugar aislado destinado para la cría de los lechones deberá estar al menos separado 3 Km. el lugar infectado más cercano. Es un método complicado para granjas de gran tamaño. Se ha utilizado a menudo para establecer núcleos genéticos de tamaño pequeño (Andrada *et al.*, 2002).
- Otros investigadores proponen un sistema de saneamiento parcial, alternativo a la repoblación con animales SPF y mucho más económico. Este sistema consiste en quitar de la granja todos los cerdos jóvenes y las cerdas de reposición, aplicando un tratamiento antibiótico de dos semanas de duración en las restantes madres más viejas para eliminar *M. hyopneumoniae*; después debe establecerse un programa de vigilancia para asegurar que no existe reentrada de la enfermedad. Otros investigadores han demostrado la utilidad de un sistema similar al anterior en granjas núcleo de producción o de ciclo cerrado. El sistema consiste en detener los partos durante 2 semanas, eliminar los lechones destetados, cerdos en crecimiento y de engorde, manteniendo en la granja solamente las hembras y machos de producción de más de 10 meses de edad, a los que se les administra durante ese tiempo un tratamiento antibiótico. Las instalaciones son limpiadas y desinfectadas; transcurridos los 14 días se continúa con la dinámica normal de partos de la granja. Posteriormente se establece un programa de vigilancia, con métodos serológicos y de PCR (Andrada *et al.*, 2002).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de estudio

El estudio, se realizó en una granja porcina tecnificada positiva a *Mycoplasma hyopneumoniae*, ubicada en el Valle del Río Chillón, distrito de Puente Piedra, Provincia de Lima. Las muestras de suero se procesaron en el Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Medicina Veterinaria - Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

La granja practica el sistema de crianza “todo dentro todo fuera”, con producción en un solo sitio; posee un plantel reproductor de 600 vientres de un cruce para línea materna y el alimento suministrado a los porcinos carece de antibióticos micoplasmicidas.

3.2 Sistema de manejo en la granja

Los lechones al nacer, ingieren el calostro, luego de esto, se uniformizan de acuerdo al tamaño y número de lechones por camada; permanecen con su madre durante 19 ± 2 días, que corresponde al período de lactación. Posteriormente se trasladan al área de recría, donde nuevamente son uniformizados y distribuidos en jaulas de acuerdo al peso, permaneciendo en esta área hasta los 70 días de edad. Al término de este periodo los lechones pasan al área de engorde distribuyéndolos en corrales con piso de cemento, uniformizándolos esta vez de acuerdo al peso y sexo; permaneciendo aquí hasta alcanzar los 90Kg. de peso vivo (peso al beneficio), que en la mayoría de animales se da alrededor de los 145 días de edad.

Durante el período que los porcinos permanecen en la granja son vacunados contra Cólera Porcino a los 45 días de edad, Rinitis Atrófica a los 7 y 21 días de edad y Erisipela Porcina a los 36 días de edad; no se practica la vacunación contra *Mycoplasma hyopneumoniae*.

La granja cuenta con un sistema de bioseguridad estricto, para lo cual posee pediluvios con desinfectantes, tanto para personas como para vehículos, además, tiene bien definida y demarcada la zona sucia de la zona limpia, lo que le permite un mejor manejo sanitario.

3.3 Animales y tamaño de muestra

Para el estudio se seleccionaron al azar 60 lechones al nacimiento, provenientes de madres a las que se les inmunizó contra *Mycoplasma hyopneumoniae* a los 85 días de gestación; obteniéndose el tamaño muestral mediante la fórmula de “Comparación de medias” (Snedecor y Cochran, 1986):

$$n = 2 \left[\frac{[Z(a) + Z(b)] SD}{m1 - m2} \right]^2 = 12 \text{ animales / grupo}$$

Donde;

Z(a): valor tabular de “z” al 95% de confianza = 1,96

Z(b): valor de “z” para 90% de potencia = 1,28

SD: desviación estándar = 2 Kg. (Valdivia, 1999)

m1: media esperada de la población 1= 84 Kg. (Valdivia, 1999)

m2: media esperada de la población 2 = 81Kg. (Valdivia, 1999)

Los lechones seleccionados procedían de madres multíparas (3 y 4 partos), las cuales presentaron buen estado sanitario al inicio del estudio; estos animales fueron identificados mediante tatuaje en la oreja, indicándose un número de dos dígitos. Luego de identificarlos, los lechones seleccionados se uniformizaron y distribuidos por el personal de la granja de acuerdo a su tamaño, manteniéndolos en el mismo lote y cuarto de maternidad, con porcinos de su misma edad. Además se les realizó las prácticas de manejo propias de la granja.

Los lechones fueron divididos en 2 grupos de 30 lechones cada uno (15 hembras y 15 machos): un grupo tratamiento (al que se le aplicó la bacterina), y uno control (al que se le aplicó solución salina estéril al 0.09% para simular el estrés generado a los animales por efecto de la vacunación).

3.4 Inmunización

Los lechones fueron inmunizados con una bacterina de dosis única contra *Mycoplasma hyopneumoniae*, con una dosis de 2ml aplicada en la tabla del cuello a los 42 días de edad.

3.5 Materiales usados durante el muestreo

- Vacutainers
- Agujas vacutainers
- Cooler
- Bolsas de hielo
- Soporte (Holder)
- Alcohol
- Algodón
- Tintura de yodo
- Vacunas de dosis única
- Jeringas de 3 ml
- Solución salina estéril al 0.9%
- Balanza analítica

3.6 Materiales y equipos usados en el Laboratorio

- Gradillas
- Pipetas monocanales y multicanales
- Tips
- Viales de 2 ml
- Soporte de viales
- Erlenmeyer

- Agua destilada o desionizada
- Kit de ELISA HerdChek* M hyo
- Centrifugadora
- Congeladora
- Espectrofotómetro

3.7 Recolección de muestras

Se realizaron 6 tomas de muestra de sangre en tubos vacutainer, a los 21, 42, 70, 84, 112 y 145 días de edad, desde el destete hasta el beneficio (21 semanas). Las muestras se obtuvieron por punción en la vena cava craneal y el suero se extrajo centrifugándolas a 3000 rpm durante 10 minutos, cada muestra fue rotulada con el número de identificación del animal y la edad del animal al momento del muestreo. El suero se conservó a - 20° C hasta ser analizado.

3.8 Procesamiento de las muestras

Los sueros fueron analizados mediante la técnica de ELISA indirecta, con el kit comercial de ELISA HerdChek* M hyo, el cual está diseñado para medir la concentración relativa de anticuerpos frente a *M. hyopneumoniae* en suero porcino, donde el cambio de color resultante de la reacción Ag–Ac está directamente relacionado con la cantidad de anticuerpos presentes en la muestra; esta prueba detecta la presencia de anticuerpos desde los 14 a 21 días post-inoculación o exposición al agente, con una especificidad de 99.67%.

3.8.1 Procedimiento del análisis

3.8.1.1 Reactivos

- Placas tapizadas con *M. hyopneumoniae*
- Conjugado antiporcino: HRPO. Contiene gentamicina como preservante
- Control positivo a *M. hyopneumoniae*. Suero porcino reactivo frente a *M. hyopneumoniae* en tampón fosfato con estabilizantes proteicos. Contiene azida de sodio como conservante.

- Control negativo a *M. hyopneumoniae*. Suero porcino no reactivo frente a *M. hyopneumoniae* en tampón fosfato con estabilizantes proteicos. Contiene azida de sodio como conservante.
- Diluyente de las muestras: tampón con estabilizadores de proteína. Conservado con azida de sodio.
- Concentrado de lavado (10X): tampón de fosfato conservado con gentamicina.
- Sustrato TMB.
- Solución de interrupción.

3.8.1.2 Preparación de las muestras

Se diluyeron las muestras a 1:40 con el diluyente de muestras antes de efectuar el análisis (es decir, se diluyó 10ul de la muestra con 390ul del diluyente), no se diluyeron los controles.

3.8.1.3 Distribución e incubación de los controles y muestras en la placa

Se tomó la placa tapizada con el antígeno y se anotó la posición de las muestras en una hoja de trabajo; luego se añadió 100 ul del control negativo en los pocillos A1 y B1, y 100 ul del control positivo en los pocillos C1 y D1 de la placa; las muestras diluidas se añadieron en los pocillos restantes en la misma cantidad y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego de transcurrido los 30 minutos de incubación, se aspiró el contenido líquido de los pocillos, se eliminó y se lavó cada pocillo de tres a cinco veces con 350ul de la solución de lavado, posteriormente, se eliminó el contenido líquido de la placa.

3.8.1.4 Adición e incubación del conjugado

Se añadió 100ul del conjugado antiporcino a cada pocillo, el cual es una peroxidasa de rábano, incubándose nuevamente durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido los 30 minutos de incubación, se procedió a lavar nuevamente la placa tal como se describe anteriormente.

3.8.1.5 Adición e incubación del sustrato

Luego del lavado, se añadieron 100 ul de la solución de sustrato TMB en cada pocillo y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.

3.8.1.6 Adición de la solución de interrupción y calibración del lector

Luego se añadió 100 ul de solución de interrupción en cada pocillo, se calibró el espectrofotómetro con una absorbancia de 650 nm A (650) y se midió y anotó los valores de absorbancia (densidad óptica).

3.8.1.7 Lectura y cálculo de los resultados

Obtenidos los valores de absorbancia (densidad óptica), se calcularon los resultados para cada muestra. El ensayo fue válido, ya que, la diferencia entre la absorbancia promedio del control positivo y del control negativo (CPx – CNx) fue mayor de 0,150, tal como lo requiere el kit comercial. La presencia o ausencia de anticuerpos frente a *M. hyopneumoniae* se determinó por medio de una relación entre el valor de densidad óptica (D.O.) de la muestra con el control positivo, el cual representa concentraciones significativas de anticuerpos frente a *M. hyopneumoniae* en el suero porcino. Las ecuaciones utilizadas por el lector de ELISA para calcular los resultados se presentan a continuación:

- a) Promedio del control negativo (CNx)

$$\text{CNx} = \frac{\text{D.O pocillo A1} + \text{D.O pocillo B1}}{2}$$

- b) Promedio del control positivo (CPx)

$$\text{CPx} = \frac{\text{D.O pocillo C1} + \text{D.O pocillo D1}}{2}$$

- c) Cociente M/P

$$\text{M/P} = \frac{\text{Valor de la muestra} - \text{CNx}}{\text{CPx} - \text{CNx}}$$

d) Título

$$\text{Log10 del título} = 1.09 (\log_{10} \text{ M/P}) + 3.36$$

3.8.1.8 Interpretación de resultados

Para determinar la positividad o negatividad de las muestras se consideraron los siguientes criterios: las muestras con coeficientes M/P menores de 0,3 se consideraron NEGATIVAS dentro de los límites de la prueba, cuando la relación M/P fue mayor o igual de 0,3 y menor o igual de 0,4, se consideró la muestra como SOSPECHOSA; las muestras con coeficientes M/P mayor de 0,4 se consideraron POSITIVAS.

3.9 Determinación de la ganancia de peso

Para determinar la ganancia de peso de los animales en estudio se realizó el pesaje individual a los 21 días (destete) y 145 días (salida al camal). La ganancia de peso se determinó mediante una resta simple entre el peso a los 21 días de edad y el peso final a los 145 días.

3.10 Determinación del porcentaje de consolidación pulmonar

Al momento del beneficio, se procedió a inspeccionar los pulmones de los animales en estudio, para lo cual se preparó una ficha donde se anotó el área del lóbulo pulmonar afectado, siguiendo el modelo descrito por Piffer y Brito (1991) citados por Sobetiansky *et al.* (2002). Los lóbulos pulmonares fueron identificados con sus respectivas abreviaturas, apical derecho (AD), apical izquierdo (AI), cardiaco derecho (CD), cardiaco izquierdo (CI), diafragmático derecho (DD), diafragmático izquierdo (DI) e intermedio (I); cada lóbulo tiene un porcentaje asignado en base al peso de cada uno de ellos y en relación al total del peso pulmonar.

En dicho modelo, se le otorga una puntuación del 0 al 4 de acuerdo al porcentaje de consolidación pulmonar encontrado en cada lóbulo (Tabla N° 1); cada puntuación tiene un valor asignado a cada lóbulo pulmonar y en relación a su peso (Tabla N° 2), de acuerdo a esto, se obtiene una sumatoria de los valores

asignados a cada lóbulo pulmonar y el valor total dado expresado en porcentaje se ubica dentro de una categoría de consolidación (Tabla N° 3). Esto, nos ayudó a calcular de manera rápida el porcentaje total de animales con neumonía (consolidación pulmonar) en todo el lote.

Tabla N° 1: Puntuación según la extensión del área 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 & Brito (1991). En Sobetiansky y col. 2002

Tabla N° 2: Área de consolidación de lóbulos pulmonares, considerándose el área consolidada y el peso relativo del lóbulo en relación al parénquima pulmonar

Puntuación (según Tab.1)	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 & Brito (1991). En Sobetiansky y col. 2002

Tabla N° 3: Puntuación relativa a las categorías de 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 & Brito (1991). En Sobetiansky y col. 2002

3.11 Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados con el programa estadístico Stata versión 8.0, donde a los datos de títulos de anticuerpos, se le aplicó la prueba de “Kolmogorov Smirnov de una muestra”, para determinar normalidad, como los datos no seguían una distribución normal, fueron evaluados mediante “Kolmogorov Smirnov de dos muestras” para analizar si existía diferencia estadística significativa entre los grupos.

Para analizar los datos de peso a los 19 días (destete), peso a los 145 días (camal) y ganancia de peso, se usó la prueba de “Análisis de Varianza por bloques”, bloqueando la variable sexo, con un nivel de significancia del 0.05; los datos de lesiones pulmonares fueron analizados mediante la prueba de “Chi Cuadrado (X^2)” para determinar si existía asociación entre mayor porcentaje de consolidación pulmonar y aplicación o no de vacuna. Se establecieron intervalos de confianza del 95%.

III. RESULTADOS

Se realizó un estudio para determinar si la inmunización con bacterina de dosis única, influye en los títulos de anticuerpos, ganancia de peso y porcentaje de lesiones pulmonares al beneficio en porcinos de crianza intensiva de la provincia de Lima.

Los datos de títulos de anticuerpos obtenidos mediante serología (ELISA) mostraron que a los 21 días de edad (1er muestreo) un 56,7%(17/30) de animales del grupo inmunizado y un 60%(18/30) del grupo control fueron seropositivos a *Mycoplasma hyopneumoniae*; manteniéndose alrededor de este porcentaje hasta los 70 días de edad, donde un 30%(9/30) seguían siendo seropositivos en el grupo inmunizado debido probablemente al efecto de la inmunización a los 42 días de edad (6 semanas), y sólo un 3,3%(1/30) en el grupo control. El porcentaje de seropositivos en el grupo inmunizado siguió elevándose hacia los 145 días de edad, llegando a ser de 60,7%(17/28). En el grupo control este permaneció bajo hasta los 112 días de edad, donde el porcentaje de seropositividad aumentó a 10,3%(3/29), tendencia que se mantuvo hasta los 145 días de edad donde un 50%(14/28) fueron seropositivos, debiéndose esto probablemente a un desafío de campo (Gráfico N° 1).

Cabe resaltar que 2 porcinos murieron durante el experimento, una hembra del grupo control murió a los 102 días de edad debido a un problema neumónico, mientras que otra hembra del grupo inmunizado murió a los 137 días de edad debido a un problema gastroentérico.

En cuanto al valor mediano del título de anticuerpos, los animales del grupo inmunizado (hembras y machos) y el control, presentaban títulos de anticuerpos

contra *M. hyopneumoniae*, con una mediana de 3,06 para el grupo inmunizado y 3,21 para el grupo control; no existiendo diferencia estadística significativa entre los títulos de anticuerpos de ambos grupos, esta tendencia se mantuvo hasta los 70 días de edad (3er muestreo) donde el título de anticuerpos en el grupo inmunizado se mantuvo alto 2,72 frente a 2,0 del grupo control, el cual disminuyó notablemente, existiendo diferencia estadística significativa ($p < 0.01$) entre ambos grupos; además en el grupo control los valores de títulos de anticuerpos fueron muy variables, llegando a ser nulos en algunos animales, debido probablemente a la caída de los anticuerpos maternos, a diferencia del grupo inmunizado, donde los valores de títulos de anticuerpos fueron más uniformes.

A los 84 días de edad (4to muestreo) el valor de título de anticuerpos del grupo inmunizado 2,83 seguía en aumento, mientras que en el grupo control el aumento fue mínimo 2.10, existiendo diferencia estadística significativa ($p < 0.01$) entre sus títulos.

A los 112 días de edad (5to muestreo) reveló un aumento del título de anticuerpos en el grupo control (2,36) probablemente debido a un desafío de campo, mientras que en el grupo inmunizado, el título de anticuerpos (2,95) siguió en aumento; existiendo diferencia estadística significativa ($p < 0.01$) entre ambos grupos.

A los 145 días de edad (6to muestreo) antes de ir a camal, los títulos de anticuerpos del grupo control seguían elevándose (2,84) y en el grupo inmunizado (3,01) estos se mantuvieron altos probablemente por efecto de la inmunización, no existiendo diferencia estadística significativa entre ambos grupos (Grafico N° 2).

También se evaluó el efecto del sexo en el porcentaje de seropositividad y el título de anticuerpos de hembras y machos de ambos grupos no encontrándose diferencia estadística significativa entre ellos, siendo sus resultados similares, por lo que el análisis se realizó en base a los resultados de los grupos en general.

Gráfico N° 1: Porcentaje de animales seropositivos a *Mycoplasma hyopneumoniae* por la prueba de ELISA durante los seis muestreos realizados, para ambos grupos.

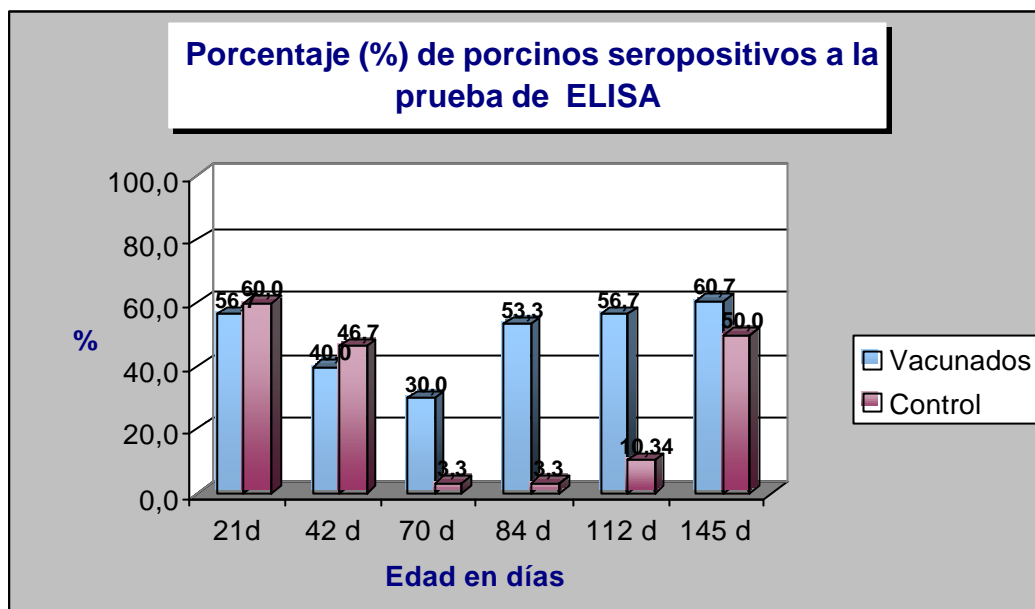
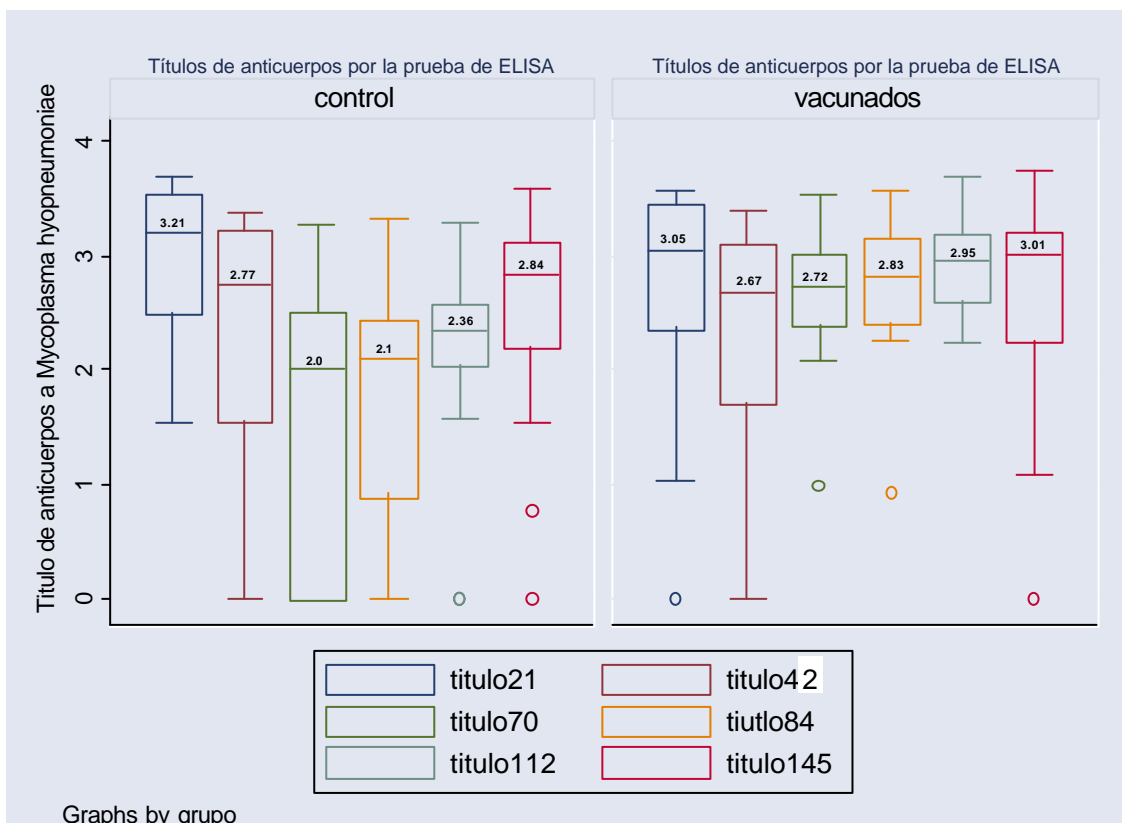


Gráfico N° 2: Títulos de anticuerpos por la prueba de ELISA durante los seis muestreos realizados, para ambos grupos.



El análisis de los pesos, reveló que no existió diferencia estadística significativa en la ganancia de peso de ambos grupos (Tabla N° 4), teniendo un promedio de ganancia de 82.85Kg. el grupo inmunizado y 82.95Kg. el control. Sin embargo, los machos del grupo inmunizado tendieron a tener más peso (89,27Kg.) que los machos del grupo control (86,79Kg.); caso contrario se observó en las hembras, donde las hembras del grupo control tendieron a tener más peso (78.84Kg.) que el grupo inmunizado (75.98Kg.) (Tabla N° 5). Además, los pesos individuales fueron muy variables en los machos del grupo control, sin embargo, hubo mayor uniformidad en la distribución de la ganancia de peso de los machos inmunizados.

Tabla N° 4: Resultados del Análisis de Varianza para la ganancia de Peso

Dependent Variable: GANANCIA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1722.364 ^a	3	574.121	13.650	0.000
Intercept	389664.477	1	389664.477	9264.149	0.000
SEXO	1606.464	1	1606.464	38.193	0.000
GRUPO	0.486	1	0.486	0.012	0.915
SEXO*GRUPO	101.677	1	101.677	2.417	0.126
Error	2229.262	53	42.062		
Total	395049.210	57			
Corrected Total	39.51.627	56			

a. R Squared = 0.436 (Adjusted R. Squared = 0.404)

Tabla N° 5: Promedio de ganancia de Peso de los porcinos (Kg. Peso vivo)

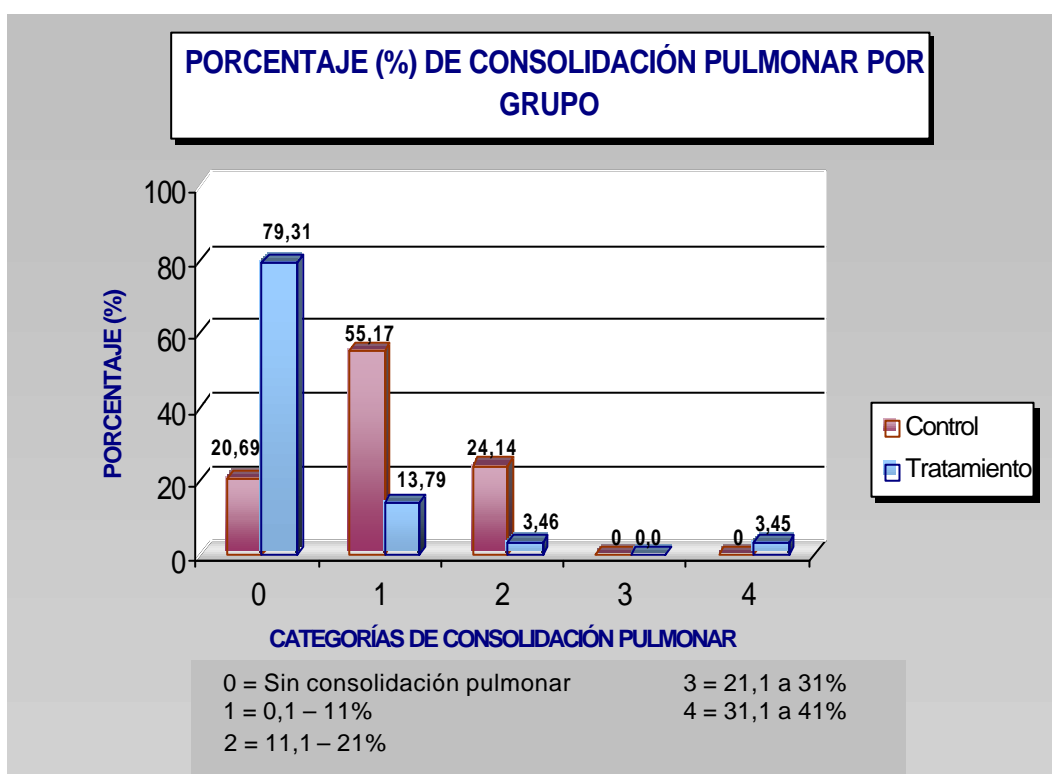
TRATAMIENTO SEXO	VACUNADOS			CONTROLES		
	Promedio	I.C. al 95%		Promedio	I.C. al 95%	
		Inf.	Sup.		Inf.	Sup.
MACHOS	89.27 ^a	86.76	91.78	86.79 ^a	82.49	91.09
HEMBRAS	75.98 ^a	71.78	80.17	78.84 ^a	75.58	82.09
TOTAL	82.85 ^a	79.44	86.27	82.95 ^a	79.97	85.93

En la evaluación de la variable sexo, como era de esperarse, existió diferencia estadística significativa entre hembras y machos de ambos grupos ($p < 0.01$) (Tabla

Nº 4), ya que los machos tuvieron en promedio mas peso 88.03 Kg. que las hembras 77.40 Kg.

El análisis de las categorías de consolidación pulmonar mostró que la mayoría de animales del grupo inmunizado se ubicaron en la categoría “0”, que corresponde a una categoría sin porcentaje de consolidación pulmonar. Las categorías 1, 2, 3 y 4 poseen porcentajes de consolidación pulmonar encontrándose aquí la mayor parte de animales del grupo control, sobretodo en la categoría “1”. No hubo animales con porcentaje de consolidación pulmonar dentro de las categorías 3, 5 y 6 (Gráfico Nº 3).

Gráfico Nº 3: Porcentaje de porcinos en alguna categoría de Consolidación Pulmonar por grupo.



En general, un 79,31%(23/29) de los animales del grupo control se ubicó en una categoría con porcentaje de consolidación pulmonar (1, 2, 3 y 4) y sólo un 20.69%(6/29) del grupo tratamiento, existiendo diferencia estadística significativa ($p < 0.01$) entre ambos grupos, lo que se vio reflejado en el análisis por sexos,

donde, entre hembras de ambos grupos también se encontró diferencia estadística significativa ($p < 0.05$); así como, en los machos de ambos grupos (Tabla Nº 6).

Tabla Nº 6: Total de porcinos en categorías 0, 1, 2, 3 y 4 con porcentaje de Consolidación Pulmonar mediante Chi Cuadrado.

Categoría	Control				Vacunado			
			Total / grupo	(%)			Total / grupo	(%)
0	2	4	6	20.69	12	11	23	79.31
1	7	9	16	55.17	2	2	4	13.79
2	5	2	7	24.14	1	0	1	3.455
3	0	0	0	0.0	0	0	0	0.0
4	0	0	0	0.0	0	1	1	3.45
Total de animales en categorías 1, 2, 3 y 4	12 ^b	11 ^b	23/29	79.31 ^b	3 ^a	3 ^a	6/29	20.69 ^a

Letras diferentes en fila denotan diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$)

IV. DISCUSIÓN

La neumonía micoplásmica, causada por *Mycoplasma hyopneumoniae*, es una de las enfermedades más prevalentes a nivel mundial en la industria porcina. Su importancia radica en la influencia negativa que ejerce sobre los parámetros productivos de los porcinos, representando grandes pérdidas económicas; además, el agente es parte del Complejo Respiratorio Porcino, donde actúa como agente primario, predisponiendo a los animales a padecer infecciones secundarias. Por ello, es necesario establecer estrategias de control de esta enfermedad en granjas porcinas tecnificadas.

El objetivo del presente trabajo fue determinar si la inmunización con bacterina de dosis única contra *Mycoplasma hyopneumoniae* influía en el título de anticuerpos y la ganancia de peso de porcinos provenientes de madres vacunadas de crianza intensiva, utilizando la técnica de ELISA indirecta. Además se determinó el grado de lesión pulmonar al momento del beneficio.

Los resultados de este estudio, muestran que el porcentaje de seropositividad, debido a la transferencia de anticuerpos maternos, fue similar para ambos grupos al inicio del experimento, estando alrededor del 60% de seropositivos, a pesar de que provenían de madres inmunizadas contra este agente. Esto difiere de lo encontrado por Torres (2003) quien halló un 100% de animales seropositivos a *Mycoplasma hyopneumoniae*. Teniendo en cuenta, que Clark (1999) demostró una correlación positiva entre los niveles de anticuerpos de las madres y sus lechones, podemos presumir que hubo una falla en el desarrollo de la inmunidad en las madres, por ello la variación encontrada en los lechones.

Probablemente, esta falla puede atribuirse al tipo de vacuna usado en la madre, ya que al ser una bacterina de dosis única, la liberación del antígeno es lenta, para permitir que la inmunidad sea duradera, provocando que las madres vacunadas a los 85 días de edad no alcancen niveles de anticuerpos suficientes para transmitir pasivamente a sus crías. Por otra parte, al ser madres de 3 y 4 partos, la infección natural en éstas, pudo haberse dado en etapas tempranas de su vida, por lo que sus linfocitos de memoria podrían no estar sensibilizados al antígeno, haciendo que la respuesta a la inmunización tome más tiempo en desarrollarse, no alcanzando niveles adecuados de anticuerpos para transmitirle a sus crías al momento del parto.

A los 42 días de edad, el porcentaje de seropositivos se mantuvo constante en ambos grupos, además los valores de títulos de anticuerpos se mantuvieron altos; lo que coincide con lo encontrado por Burch (2003a) quien reporta que los lechones con un nivel significativo de anticuerpos iniciales, pueden mantener niveles significativos de anticuerpos hasta 60 días después. En el Perú, Calle *et al.*(2003) encontraron que los anticuerpos transmitidos por madres vacunadas comienzan a descender a partir de los 56 días (8 semanas). Sin embargo, Thacker (1997) afirma que el nivel de anticuerpos y la duración de los mismos varían entre los diferentes individuos y granjas.

El porcentaje de seropositivos hacia los 70 días de edad (10 semanas) se mantuvo alto en el grupo inmunizado, a diferencia del grupo control, que disminuyó notoriamente, encontrándose valores bajos en sus títulos de anticuerpos. Esta diferencia pudo deberse a la respuesta a la vacunación a los 42 días de edad, mientras que en el grupo control los anticuerpos maternos ya estaban desapareciendo. Además, hubo una menor variación entre el valor de los títulos de anticuerpos del grupo inmunizado frente al control, siendo estos títulos más uniformes, lo que se mantuvo en los siguientes muestreos.

Entre los 70 y 84 días de edad los animales del grupo control tuvieron valores de títulos de anticuerpos muy bajos llegando a ser nulos en algunos animales, lo que probablemente, al carecer de anticuerpos contra el agente, los hizo susceptibles a éste. Cabe resaltar, que esta etapa coincide con la transición de la etapa de recría a la fase de engorde, por lo tanto, el reagrupamiento de los animales en corrales de engorde, lo que los somete al estrés ocasionando una

baja en su estado inmunitario. Al respecto, León *et al.* (2001) encontraron resultados similares, afirmando que el momento crítico para la transmisión de la enfermedad se da en la etapa de engorde donde la concentración de anticuerpos maternos está disminuida.

En el grupo inmunizado se observó una ligera caída a los 70 días (10 semanas) comenzando nuevamente a aumentar hacia los 84 días (12 semanas) de edad, tendencia que se mantuvo hasta los 145 días; debido probablemente a la influencia de la vacuna, la cual, pudo haber inducido una respuesta inmune efectiva en algunos animales, siendo esta respuesta mayor, a las 6 semanas postvacunación.

El período (entre los 70 – 84 días) donde los animales tuvieron bajo nivel de anticuerpos, pudo ser determinante para que el micoplasma infectara a los cerdos e indujera seroconversión en estos animales en los siguientes muestreos, ya que, según Torres (2003) es necesario un nivel de anticuerpos maternos bajos en la mayoría de la población para que se presente la infección; mientras que en el grupo inmunizado debido al efecto de la vacuna los porcinos pudieron responder mejor a una infección natural.

Es así que la seroconversión en el grupo control comenzó a los 112 días (16 semanas), coincidiendo esto, con lo expuesto por Clark (1999) quien afirma que la seroconversión se da 4 semanas después de la exposición al agente; además, esta respuesta se hizo más fuerte hacia los 145 días de edad (20 semanas). Blood *et al.* (1999) reportó el mayor índice de seroconversión entre las 12 y 16 semanas de edad; y Joo *et al.* (1988) afirman que la seroconversión después de una infección natural se da 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. Sin embargo, difiere con lo encontrado por Torres (2003) donde la seroconversión por exposición natural se dio a las 12 semanas, sugiriendo que la infección natural se dio alrededor de las 9 semanas de edad.

Se desconoce lo que induce la seroconversión en los animales, sin embargo, Thacker (2001) sugiere que ésta podría deberse a un aumento en la carga microbiana hasta un período crítico donde la exposición al agente es mayor, lo que desencadena la producción de anticuerpos en respuesta a la alta carga antigénica.

Como se observa en este estudio, el retraso en el momento de seroconversión de los porcinos del grupo control, pudo deberse a la gran variación encontrada entre los títulos de anticuerpos de los animales, indicando que no todos los animales seroconvirtieron en el mismo momento. Además, en condiciones de campo la seroconversión se retrasa en comparación con las infecciones experimentales (Calsamiglia *et al*, 1999). También puede deberse a que existe una variación de la respuesta inmune entre los porcinos debido a diferencias genéticas (Goodwin, 1985); además los animales probablemente estuvieron expuestos a *M. hyopneumoniae* en diferentes momentos.

Si bien es cierto, se observó una seropositividad considerable al inicio del experimento para ambos grupos, ésta no llegó a ser del 100%, inclusive después de inmunizar a un grupo de los lechones a los 42 días de edad (6 semanas), donde el porcentaje de seropositividad llegó a ser sólo del 60% indicando que la respuesta a la vacuna fue muy variable. Esto podría deberse, probablemente, a la presencia considerable de anticuerpos maternos en algunos lechones al momento de la inmunización, lo que pudo haber interferido con el efecto de la vacuna en estos animales.

Según Thacker *et al*. (1998) la interferencia de anticuerpos maternos puede o no darse dependiendo de la edad de la vacunación, estableciendo que ésta se da, si se realiza entre las 2 y 4 semanas de edad, o cuando hay niveles elevados de anticuerpos; en cambio, si se realiza entre las 4 y 6 semanas de edad no interferirá con la respuesta inmune inducida por la vacunación (E. Thacker, 2001). Esto se corrobora, con lo encontrado por otros investigadores, donde la vacunación realizada unas semanas más tarde puede mejorar la eficacia de la vacuna, posiblemente, debido a un menor impacto de los anticuerpos maternos en los lechones. La influencia de los anticuerpos maternos puede variar entre las distintas granjas (Jensen *et al*, 2000; Pommier *et al*, 2000; Thacker *et al*, 2000). Estos datos indican que es más importante el nivel de anticuerpos de los lechones, que la edad de los mismos en lo que se refiere a la interferencia de los anticuerpos maternos en la inmunización activa (Jayappa *et al*, 2001).

Esto plantea la interrogante, sobre si es conveniente vacunar a las madres y sus crías. Al respecto, Pijoan y Torremorell (1999) establecieron que en granjas convencionales, la presión de infección de orígenes ajenos al grupo de destete es

muy grande, presentándose la infección en forma tardía. Por esta razón, es conveniente vacunar sólo a la línea de producción y no a las madres. Es claro, que no es conveniente vacunar a las madres y los lechones, en presencia de anticuerpos maternos, debido a la interferencia con estos.

Algo que llama la atención, es que la inmunización en este experimento se realizó con una bacterina de dosis única, las cuales para tener un efecto positivo sobre el título de anticuerpos, los parámetros productivos y la reducción de lesiones pulmonares al matadero, contienen una carga antigénica mayor para emular el efecto booster que se obtiene con la vacunación a dos dosis. Además poseen adyuvantes que hacen que la liberación del antígeno sea lenta y así estimular una respuesta inmune duradera en el animal.

Según Burch (2002), los anticuerpos maternos pueden interferir con la vacuna dependiendo de la carga antigénica de la misma; aun así, en este estudio hubo una interferencia de los anticuerpos maternos con la vacuna, si bien es cierto esta interferencia no fue del 100%, aproximadamente un 40% de animales no llegaron a seroconvertir.

El análisis por sexos de los resultados obtenidos por serología no mostraron diferencia estadística significativa en ninguno de los seis muestreos realizados, tanto en el porcentaje de seropositivos, como en los valores de títulos de anticuerpos. Siendo similar a lo encontrado por Calle *et al.* (2003) quienes establecieron que el sexo no ejerce ningún efecto sobre la persistencia de anticuerpos en los porcinos, más si, la condición inmunológica de la madre.

El análisis de la ganancia de peso reveló que no existió diferencia estadística significativa entre pesos. Estos resultados difieren con lo encontrado por varios investigadores, que reportan beneficios en la ganancia de peso debido a la influencia de la vacunación comparado con sus controles. Al respecto, Jensen *et al.* (2000) en un metanálisis de 41 estudios, en los que se emplearon dos bacterinas comerciales, mostraron un incremento significativo en la ganancia diaria de peso de los cerdos vacunados comparados con el control. En el Perú, Valdivia (1999) también reportó una diferencia significativa entre la ganancia de peso de animales vacunados con bacterinas de dos dosis y sus controles.

Sin embargo, en dos estudios realizados por Dawson *et al.* (2002b) donde se utilizó la vacunación con una dosis, se encontró que: en el primero de ellos,

realizado con infección experimental, la ganancia de peso del cerdo vacunado era significativamente más alto que sus controles; y en el segundo realizado con exposición de campo, la diferencia no era significativa. Esto se atribuye a que en estudios de campo se subvaloran a menudo los efectos de vacunación en los parámetros productivos, porque los animales vacunados se exponen a más organismos de *M. hyopneumoniae*, excretados por los cerdos no vacunados, que si la unidad entera hubiera sido vacunada. Además, en dicho estudio los cerdos vacunados, estuvieron alojados con los cerdos control, aumentando grandemente la exposición al agente.

Probablemente, una situación inversa pudo darse en este estudio, donde la inmunidad se mantuvo constante por un tiempo mayor al establecido en otros estudios. Además, los animales del grupo control compartieron el mismo ambiente que los animales inmunizados, si bien es cierto, los animales permanecieron en diferentes corrales, estos permanecían en una misma área, lo que pudo permitir que menor cantidad de microorganismos fueran eliminados, disminuyendo la carga bacteriana de *M. hyopneumoniae*, por tanto, los animales del grupo control pudieron estar expuestos a menos microorganismos, resultando en una ganancia de peso similar a los inmunizados.

El análisis por sexos de la ganancia de peso reportó diferencia estadística significativa a favor de los machos, siendo el promedio de ganancia de peso superior al de las hembras. Esto puede deberse a una predisposición genética natural, a que los machos tengan más peso que las hembras, como ocurre en la mayoría de las especies.

En la evaluación del porcentaje de consolidación pulmonar existió diferencia estadística significativa a favor del grupo inmunizado. Tomando en cuenta sólo las categorías que tenían algún porcentaje de lesión pulmonar se observó que hubo una prevalencia de 79,31% de animales en algunas de estas categorías en el grupo control, frente a sólo un 20,69% en el grupo inmunizado; existiendo una reducción en el porcentaje de consolidación pulmonar en el grupo inmunizado de 79,31%.

Estos resultados superan lo encontrado por otros investigadores, donde la reducción del porcentaje en las lesiones pulmonares en animales vacunados alcanza el 66% según Goodwin (1984) y 57.4% según Hannan *et al.* (1997).

Dawson *et al.*(2002a) reporta una reducción de 50-60% en el record de lesiones pulmonares en animales vacunados con una dosis, comparado con los controles. Además, B. Thacker y E. Thacker (2001) afirman que los niveles de neumonía en los cerdos vacunados son significativamente menores que los niveles encontrados en el grupo control sin vacunación

La vacunación en los animales puede reducir las lesiones pulmonares, pero esta respuesta puede ser muy variable entre granjas. Ambos programas de vacunación con una o dos dosis son eficaces, ninguno previene las lesiones pulmonares en un 100%, pero induce células de memoria para un posterior desafío (Burch, 2002), esto coincide con lo encontrado en este estudio, donde, si bien es cierto hubo un bajo porcentaje de animales en alguna categoría de consolidación pulmonar hubo un 20, 69% que presento lesiones neumónicas.

Scheidt y col (1990) demostraron que las lesiones pulmonares están reducidas cuando la vacunación inicial se retarda hasta que los cerdos tengan 6 semanas de edad en lugar de 1 semana; este concepto se aplicó en este experimento, donde la inmunización se realizó a los 42 días de edad (6 semanas) y se observó un efecto positivo de la vacuna en el porcentaje de consolidación pulmonar en los animales inmunizados.

Además Siugzdaite y Garlaite (2002) afirman que 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. Un estudio realizado por Llopart *et al.* (2002) concluyó que la administración de un programa vacunal de una dosis induce una respuesta inmune humoral y reduce las lesiones pulmonares comparado con los animales no vacunados.

Dawson y col (2002b) reportó una reducción en el récord de lesiones pulmonares en los cerdos vacunados con dosis única, comparado con el control. Variaciones en el estado sanitario de los animales debido a otras enfermedades, probablemente contribuye a las variaciones en las lesiones pulmonares y en la ganancia diaria de peso observada entre las granjas.

A pesar de que en este estudio no se realizó un análisis sobre el impacto económico de la vacunación en estos animales se puede inferir que la reducción en los costos de mano de obra por vacunar a los cerdos con vacunas de una sola

aplicación combinado con la reducción en el score de lesiones pulmonares y una mejora en la ganancia de peso similar a la vacunación con dos dosis, puede mejorar los beneficios económicos cuando se usa vacunas de dosis única; además del ahorro obtenido por concepto de antibióticos (Dawson *et al*, 2002b).

Un adecuado monitoreo serológico de los porcinos durante toda su etapa productiva nos ayudará a establecer el momento óptimo de vacunación y las medidas adecuadas a tomar según el sistema de producción que se utilice en esa granja, ya que, esto puede influir en la carga bacteriana y el momento de exposición al agente; las instrucciones que vienen en las etiquetas de las vacunas, no siempre son efectivas, porque en esta enfermedad cada granja es una experiencia distinta y estas podrían no ser las adecuadas, si se siguen sin tomar en cuenta otros factores involucrados en la infección con *M. hyopneumoniae*. Además, se debe tener en cuenta que la presencia de anticuerpos maternos puede interferir en la eficacia de la vacuna si la inmunización se realiza en presencia de altos títulos de anticuerpos maternos, aconsejándose en algunos casos retrasar la vacunación (Quinlan, 1998).

Los resultados del presente estudio demuestran que la inmunización con bacterinas de dosis única a las 6 semanas de edad, tiene un efecto positivo en los títulos de anticuerpos, así como, en la reducción de las lesiones neumónicas al beneficio; aunque, la mejora en la ganancia de peso de los animales inmunizados no se logró en este estudio.

V. CONCLUSIONES

- Alrededor del 60% de los animales fueron seropositivos a *M. hyopneumoniae* a los 21 días de edad.
- La inmunización con bacterina de dosis única a los 42 días de edad (6 semanas) incrementó los títulos de anticuerpos de los porcinos en estudio en el 60% de los animales.
- La seroconversión en este estudio, se dio en el grupo control a las 16 semanas de edad, lo que coincide con el inicio de la etapa de engorde.
- La inmunización con bacterina de dosis única no ejerció efecto sobre la ganancia de peso en los porcinos del presente estudio.
- La inmunización con bacterina de dosis única redujo el porcentaje de consolidación pulmonar al beneficio en un 70, 31%.
- El sexo no ejerció influencia en el nivel de títulos de anticuerpos presentes en suero.

VI. RECOMENDACIONES

- Aunque la vacunación es una herramienta efectiva en controlar la infección por *M. hyopneumoniae*, se deben adoptar además, otras medidas orientadas a mejorar el manejo de los animales y verificar que las condiciones de temperatura, humedad, ventilación acumulación de amoniaco, diseño de instalaciones y medicación estratégica, sean las adecuadas, sobre todo en la fase del final de recría y comienzo del engorde.
- Antes de elegir un programa de vacunación se debe realizar un monitoreo serológico de la granja, a fin de establecer un mejor esquema vacunal.
- Se debe evaluar detenidamente la conveniencia de vacunar a las madres y a sus lechones, de acuerdo al sistema de producción usado en cada granja.
- Se deben realizar estudios para determinar si la sola vacunación en los lechones es suficiente para tener una respuesta efectiva contra este agente.
- Son necesarios estudios en los que no se use la inmunización en las madres, y se pruebe la influencia de la vacunación a una dosis.

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 Albrechts, S.R. 1994. Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida* infections in swine. *JAVMA*, 204(1):102-7.
- Amrstrong, 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; Fernández, A; Del Pozo, M; Sánchez-Vizcaíno, JM. 2002. Neumonía Enzoótica. En Curso Virtual de enfermedades de los cerdos. <http://www.sanidadanimal.info/curso/10/10-neumonia.htm>. Realizado grandes

- especialistas en enfermedades infecciosas del ganado porcino de España.
Miércoles, 18 de Febrero del 2004.
- Baekbo, P; Madsen, KS; Larsen, LP; Szancer, J. 1994. Eradication of *Mycoplasma hyopneumoniae* from infected herds without restocking. Proc. Int. Pig Vet. Soc. p: 135
- Baekbo, P.2000. Management concepts to control pneumonia. Pig progress. Respiratory diseases IV. p: 12-14.
- 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.
- Betts, A. 1952. Respiratory diseases of pigs. V. Some clinical and epidemiological aspects of virus pneumonia of pigs. Vet. Rec. 64: 283-288.
- 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. Hinchellf, 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. 2002. The role of maternally derived antibodies, age and other factors on vaccinal response. Octagon technical papers; September. En <http://www.octagon-services.co.uk>. Miércoles, 18 de Febrero del 2004.
- Burch, D. 2003a. Mycoplasma vaccination - One shot or two?. Pig World. En <http://www.octagon-services.co.uk>. Miércoles, 18 de Febrero del 2004.
- Burch, D. 2003b. Mycoplasma vaccines & Passive immunity the effect of maternally delivered antibodies and piglet age vaccinal response. Pig World. En <http://www.octagon-services.co.uk>. Miércoles, 18 de Febrero del 2004
- Calle, ES.; Camacho, SC.; Torres, AM.; Falcon, 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. 1999. *Mycoplasma hyopneumoniae*: Epidemiología y control. CIENCIAS VETERINARIAS. En http://www.colvet.es/infvet/jun01/ciencias_v/articulo1.htm. Miércoles, 18 de Febrero del 2004.
- 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, SC. y Calle, ES. 2003. Neumonía Enzootica 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.*
- 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. *Mycoplasma hyopneumoniae* Pneumonia Control Strategies. *Proceedings Leman Swine Conference*; 27: 87-91.

- 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.
- Dayalu, K. 1990. Vaccine Research Findings. Smithkline Beecham Animal Health *Mycoplasma Pneumonia* Symposia May 29,31,1990; August 22,23,24,1990.
- Dayalu, K; Keich, R; Charlier, P. 1997. Evaluation of the beneficial effects of a *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccines (RespiSure) – results from controlled and field studies. IPVS. Proc: 136.
- Dawson, A; Thevasagayam, S; Sherington, J; Mackinnon, JD; Stipkovits, LP; Peters, AR. 2002a. The duration of immunity after vaccination with a single dose *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine and the effect of serological status on lung lesion scores. Pig Journal; 50: 83 – 92.
- Dawson, A; Harvey, RE; Thevasagayam, SJ; Sherington, J; Peters, AR. 2002b. Studies of the field efficacy and safety of a single dose *Mycoplasma hyopenumoniae* vaccine for pigs. The Veterinary Record; 2: 535 – 538.
- DeBey, M. 1992. Ph.D. thesis. Iowa State University, Ames.
- 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 *M. hyopneumoniae* infections. J Swine health prod; 9(5): 233 – 237.
- Djordjevic, SP; Eamens, EG; Romalis, LF; Nicholls, PJ; Taylor, V; Chin, J. 1997. Serum and mucosal antibody responses and protection in pigs vaccinated against *Mycoplasma hyopneumoniae* with vaccines containing a denatured membrane antigen pool and adjuvant. Aust Vet J;75: 504-511
- Done, SH. 1991. Enviromental factors affecting the severity of pneumonia in pigs. Vet Rec, 128: 582-586.
- Done, SH. 1997. Enzootic pneumonia (mycoplasmosis) revisited. The pig Journal.

- 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.
- 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.46914DF4-3E3D-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.
- Gulrajani, TS. y Beveridge, W. 1951. Studies on respiratory diseases of pigs. IV. Transmission of infectious pneumonia and its differentiation from swine influenza. *Sour. Comp. Path. and Therap.* 61: 118.
- Hjarre, A. 1958. Enzootic virus pneumonia and Glasser's disease of swine. *Academy Press, Nueva York y Londres. Advances in Vet. Sci.* 4: 235.
- Halbur, PG. 1997. Making the diagnosis with Serology, antigen detection and PCR. *Proceedings of the Iowa State University Veterinary Medicine Seminar.* p: 37.
- 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.

- Huallanca, A. 1999. Determinación de reactores positivos a *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos sacrificados en un camal frigorífico. Tesis Bachillerato Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor San Marcos, Lima - Perú. P: 24-40.
- Huallanca, A.; Hung, ChA.; Noé, MN.; Suarez, AF. 2001. *Mycoplasma hyopneumoniae* en cerdos beneficiados en un matadero de Lima Metropolitana. Rev. Inv. Vet. Perú, 12(1).
- 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
- 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.
- 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 32nd 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.
- Jensen, CS; Ersbolla, AK; Nielson, JP. 2000. A meta-analysis comparing the effects of vaccines against *Mycoplasma hyopneumoniae* on daily weight gain. *Proceedings 9th Int Soc Vet Epid & Econ*, 641-643.

- 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.
- Köbe, K. 1933. Die Aetiologie der Ferkelgrippe (enzootische pneumonia des Ferkels) *Zentralb f. Bakt. Parasit. U Infekt.* 129: 161.
- Kobisch, M. y Friis, NF. 1996. Swine mycoplasmoses. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.* 15: 1569-1606.
- 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.
- Llopart, D; Clota, J; March, R; Navarra, I; Riera, P; Artigas, C. 2002. Evaluation de la efficacy of a single dose *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination programme in challenged pigs. *Pig Journal*; 50: 8 – 27.
- 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.
- 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* 52: 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. 1984. PhD Thesis, University of Minnesota.
- 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.
- 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.
- Pijoan, C. y Torremorell, M. 1999. Interacciones y epidemiología en las enfermedades respiratorias del cerdo. Jornadas técnicas de actualización en Porcicultura-Serpor 99. pag: 7 – 14.

- Pijoan, 2001. *Mycoplasma* Eradication. En: http://academic-server.cvm.umn.edu/sdec/Mycoplasma_Eradication.pdf. Jueves, 01 de julio del 2004.
- Pijoan, C. 2002. Update on *Mycoplasma* Research at the SDEC. En: http://academicserver.cvm.umn.edu/sdec/Update_on_Mycoplasma_research_at_the_SDEC.pdf. Jueves, 01 de julio del 2004.
- Piffer, IA. y Ross, RF. 1984. Effect of age on susceptibility of pigs to *Mycoplasma hyopneumoniae* pneumonia. *Am. J. Vet. Res.*, 45: 478-481
- Plomgaard, J; Vestergaard-Nielsen, K; Ystergaard, S; Frikjaer, T; Szancer, J. 1992. An attempt to eliminate *Mycoplasma hyopneumoniae* by Medicated Early weaning (MEW). *Proc. Int. Pig Vet. Soc.* p: 301
- Plonart, H. y Bickhardt, K. 2001. Manual de enfermedades del cerdo. Acribia: España. pags: 141 – 147.
- Pommier, P.; Keita, A.; Pagot, E.; Walters, JR.; Flochlay, A. 2000. Field efficacy of a *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine in the control of enzootic pneumonia in swine. *Rev. Sci. Med.* 151, 835-840.
- 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.
- Pullar, EM. 1948. Infectious pneumonia of pigs. I. General description, differential diagnosis, and epidemiology. *Australia Vet. Sour.* 24: 320.
- Quinlan, J. 1998. delay vaccination. *Pig International*; (28): 5-29.
- 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 Mmedicine*; 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 20th.
- Razin, S. y Jacobs, E. 1992. *Mycoplasma* adhesion. *J. Gen. Microbiol.* 138:407–422.
- Rislakki, V. 1953. Om dem i Finland före kommande smittosamma grishostans etiologi. *Infektion sförsök. Nord. Vet. Med.* 5: 113.

- 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. 1973. Pathogenicity of swine mycoplasmas. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 225:347-368.
- Ross, RF. 1986. Mycoplasmal disease, p. 469–483. 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.
- Ross, RF. 1992. Mycoplasmal diseases, p. 537-551. In A. D. Leman, B. Straw, W. L. Mengeling, S. D'Alaire, and D. J. Taylor (ed.), *Diseases of swine*, 7th ed. Iowa State University Press, Ames.
- Ross, RF. 1999. Mycoplasmal diseases. In: *Diseases of swine, 8th edition*. Iowa State University Press, 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, GW. y Cochran, WG. 1986. Statistical Methods. 7ma ed. The Iowa State University Press. ISBN: 8138-1560-6.
- Sobetiansky, J; Pacheco, M; Matías de Souza, C. 2002. Monitoria Patológica de cerdos en mataderos. Goiania – Brasil.
- Stärk, K; Keller, H; Eggenberger, E. 1992. Risk factors for the reinfection of specific pathogen-free pig breeding herds with enzootic pneumonias. Vet Rec 131: 532-535
- Stärk, K; Nicolet, J; Frey, J. 1998. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by Air Sampling with a 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 seroconversion 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, BJ.; Boettcher, T.; Anderson, T.; Thacker, E.; Young, T. 1998. The influence of passive immunity on serological responses to *Mycoplasma*

- hyopneumoniae* vaccination. Proc 15th Int. Pig Vet. Soc.; Birmingham, UK. p: 154
- 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. 1997. Mcoplasma 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, EL; Halbur, PG; and Thacker BJ. 1999a. 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.
- Thacker, E; Halbur, P; Ross, R; Thanawongnuwech, R; Thacker, B. 1999b. *Mycoplasma hyopneumoniae* Potentiation of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus-Induced Pneumonia. Journal of Clinical Microbiology, 37(3): 620-627
- Thacker, E. 2000. Mycoplasma vaccines: commercial and autogenous, my experiences. Swine Disease Conference for Swine Practitioners : 77-79.
- 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, EL. 2001.Mycoplasma diagnosis and inmunity: Proceddings, American Association of Swine Veterinarians 32nd annual: 467 – 469,
- Thacker, EL; Thacker, BJ; Janke, BH. 2001. Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and Swine Influenza Virus. Journal of Clinical Microbiology; 39(7): 2525-2530.
- 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.
- 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.
- 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.
- Torres, AM.; Calle, ES.; Cerón, M.; Zacarías, RE.; Falcón, PN.; Morales, MC. 2003. Evaluación de la cinética de la infección con *Mycoplasma hyopneumoniae* en porcinos de crianza intensiva. III Congreso Nacional de Porcicultura & Expo Porcina. UNALM: Perú.
- 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.
- Van Nes, A.; Mombarg, MJ.; Mirck, MH.; Hunneman, WA.; Verheijden, JHM. 2000. The efficacy of vaccination against *M. hyopneumoniae* in a Dutch multicenter trial. *Proceedings 16th IPVS Congress, Melbourne, Australia.* 1: 460.
- 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.
- Vega, GI. 1969. Neumonía Porcina, estudio bacteriológico y anatomo-histopatológico. Tesis de Bach, Fac. Med. Vet., Univ. Nac. Mayor de San Marcos. Lima-Perú
- 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. 14th 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.
- Wesslen, T. y Lannek, N. 1954. The isolation and cultivation in tissue cultura of a cytopathogenic agent from pigs with enzootic pneumonia (so-called virus pneumonia). Nord. Vet. Med. 6:481.
- 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^a 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 surveyd 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 Lemam 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.

VIII. APÉNDICES

Apéndice 1.

Nº	S	GRUPO	MUESTREOS																		PARAMETROS PRODUCTIVOS				
			1er M / 21 DIAS			2do M / 46 DÍAS			3er M / 70 DÍAS			4to M / 84 DÍAS			5to M / 112 DÍAS			6to M / 145 DÍAS			PESO I	PESO F	GANANCIA DE PESO	IDN	
			DO	TA	RES	DO	TA	RES	DO	TA	RES	DO	TA	RES	DO	TA	RES	DO	TA	RES	DO	TA	RES		19 DÍAS
Inmunizados																									
1J	1	1	0.138	2.01	0	0.088	1.22	0	0.190	2.90	2	0.119	2.45	0	0.153	2.47	0	0.357	3.45	1	6.00	106.0	100	0	
2J	1	1	0.543	3.25	1	0.235	2.84	2	0.095	2.09	0	0.230	3.01	1	0.340	3.19	1	0.17	2.95	1	6.80	103.0	96,2	0	
3J	1	1	0.255	2.74	0	0.107	1.96	0	0.292	3.20	1	0.385	3.32	1	0.359	3.23	1	0.238	3.20	1	6.10	101.9	95,8	0	
4J	1	1	0.875	3.52	1	0.342	3.09	1	0.105	2.27	0	0.137	2.54	0	0.164	2.56	0	0.093	2.24	0	7.00	97.9	90,9	0	
5J	1	1	0.408	3.08	1	0.172	2.58	0	0.153	2.72	0	0.182	2.81	2	0.35	3.21	1	0.408	3.53	1	7.00	95.9	88,9	0	
6J	1	1	0.729	3.42	1	0.278	2.95	1	0.106	2.29	0	0.113	2.30	0	0.142	2.36	0	0.073	1.10	0	6.80	94.9	88,1	0	
7J	1	1	0.151	2.18	0	0.081	0	0	0.106	2.29	0	0.189	2.84	2	0.319	3.15	1	0.205	3.09	1	6.90	94.9	88	1	
8J	1	1	0.915	3.54	1	0.445	3.25	1	0.115	2.41	0	0.123	2.42	0	0.139	2.32	0	0.084	1.99	0	7.20	94.9	87,7	0	
9J	1	1	0.141	2.06	0	0.074	0	0	0.076	0.98	0	0.079	0.93	0	0.133	2.24	0	0.083	1.95	0	7.00	94.9	87,9	0	
10J	1	1	0.83	3.49	1	0.356	3.11	1	0.133	2.58	0	0.177	2.78	0	0.17	2.60	0	0.18	3.00	1	6.90	92.9	86	1	
11J	1	1	0.113	1.30	0	0.074	0	0	0.116	2.42	0	0.214	2.93	2	0.272	3.03	1	0.611	3.75	1	5.60	92.9	87,1	2	
12J	1	1	0.632	3.34	1	0.198	2.70	0	0.159	2.75	0	0.235	3.00	1	0.794	3.69	1	0.513	3.66	1	6.90	91.8	84,9	0	
13J	1	1	0.517	3.22	1	0.191	2.67	0	0.155	2.73	0	0.184	2.82	2	0.196	2.75	0	0.215	3.13	1	5.50	91.9	86,4	0	
14J	1	1	0.208	2.56	0	0.10	1.80	0	0.252	3.10	1	0.347	3.26	1	0.306	3.12	1	0.183	3.01	1	5.80	91.9	86,1	0	
15J	1	1	0.785	3.46	1	0.468	3.28	1	0.143	2.65	0	0.118	2.36	0	0.138	2.31	0	0.086	2.06	0	5.00	89.9	84,9	0	
16J	0	1	0.187	2.45	0	0.099	1.77	0	0.221	3.01	1	0.299	3.16	1	0.295	3.09	1	0.135	2.74	0	6.60	88.9	82,3	4	
17J	0	1	0.106	0	0	0.097	1.71	0	0.418	3.41	1	0.48	3.44	1	0.437	3.35	1	0.307	3.36	1	6.10	88.9	82,8	0	
18J	0	1	0.11	1.03	0	0.077	0	0	0.264	3.13	1	0.309	3.18	1	0.285	3.07	1	0.156	2.88	2	7.10	87.8	80,7	1	
19J	0	1	0.954	3.57	1	0.598	3.41	1	0.39	3.37	1	0.457	3.42	1	0.39	3.28	1	0.185	3.02	1	5.10	87.8	82,7	0	
20J	0	1	0.162	2.28	0	0.532	3.35	1	0.169	2.80	2	0.173	2.77	0	0.178	2.65	0	0.477	3.62	1	6.00	87.8	81,8	0	
21J	0	1	0.928	3.55	1	0.375	3.14	1	0.111	2.36	0	0.114	2.31	0	0.272	3.03	1	0.446	3.58	1	6.10	86.8	80,7	1	
22J	0	1	0.195	2.50	0	0.11	2.02	0	0.51	3.53	1	0.554	3.52	1	0.496	3.43	1				6.50				
23J	0	1	0.459	3.15	1	0.193	2.68	0	0.114	2.40	0	0.11	2.26	0	0.17	2.60	0	0.066	0	0	5.00	84,9	79,9	0	

Apéndice 1 (Continuación).

24J	0	1	0.863	3.51	1	0.412	3.20	1	0.131	2.56	0	0.122	2.41	0	0.143	2.37	0	0.075	1.43	0	6.10	84,8	78,7	
25J	0	1	0.331	2.94	2	0.308	3.02	1	0.158	2.75	0	0.24	3.02	1	0.215	2.84	2	0.102	2.40	0	5.20	83,8	78,6	0
26J	0	1	0.768	3.45	1	0.254	2.89	2	0.113	2.38	0	0.118	2.36	0	0.175	2.64	0	0.094	2.26	0	7.00	75,7	68,7	0
27J	0	1	0.549	3.26	1	0.216	2.77	0	0.146	2.67	0	0.175	2.78	0	0.203	2.79	0	0.114	2.56	0	5.00	75,7	70,7	0
28J	0	1	0.175	2.38	0	0.086	0.98	0	0.169	2.80	2	0.249	3.04	1	0.225	2.88	2	0.229	3.17	1	5.10	74,7	69,6	0
29J	0	1	0.199	2.52	0	0.095	1.63	0	0.177	2.84	2	0.294	3.15	1	0.276	3.04	1	0.198	3.07	1	5.60	69,5	64	0
30J	0	1	0.376	3.02	1	0.135	2.33	0	0.456	3.46	1	0.625	3.59	1	0.551	3.49	1	0.221	3.15	1	6.00	68,6	62,6	0
Controles																								
1H	1	0	0.647	3.53	1	0.445	3.25	1	0.135	2.50	0	0.12	2.27	0	0.168	2.59	0	0.126	2.67	0	7.50	94.4	86,9	
2H	1	0	0.788	3.64	1	0.574	3.39	1	0.168	2.73	0	0.144	2.52	0	0.141	2.34	0	0.401	3.52	1	6.50	84.0	77,5	1
3H	1	0	0.729	3.60	1	0.54	3.36	1	0.148	2.60	0	0.131	2.40	0	0.262	3.00	1	0.465	3.60	1	6.50	89.6	83,1	2
4H	1	0	0.492	3.38	1	0.285	2.97	1	0.116	2.29	0	0.109	2.09	0	0.147	2.41	0	0.294	3.34	1	6.80	92.6	85,8	1
5H	1	0	0.628	3.52	1	0.425	3.22	1	0.114	2.26	0	0.121	2.28	0	0.161	2.54	0	0.247	3.22	1	6.20	83.1	76,9	2
6H	1	0	0.641	3.53	1	0.406	3.19	1	0.104	2.08	0	0.112	2.15	0	0.156	2.49	0	0.135	2.74	0	6.50	99.2	92,7	1
7H	1	0	0.867	3.69	1	0.546	3.36	1	0.161	2.69	0	0.148	2.55	0	0.227	2.89	2	0.124	2.65	0	6.20	91.6	85,4	1
8H	1	0	0.131	2.24	0	0.093	1.55	0	0.079	0	0	0.09	1.35	0	0.129	2.18	0	0.091	2.19	0	5.10	103.2	98,1	1
9H	1	0	0.7	3.58	1	0.437	3.24	1	0.129	2.44	0	0.134	2.43	0	0.145	2.39	0	0.086	2.06	0	6.20	100.3	94,1	
10H	1	0	0.183	2.66	0	0.112	2.05	0	0.155	2.65	0	0.215	2.89	2	0.326	3.16	1	0.17	2.95	1	6.80	93.6	86,8	1
11H	1	0	0.778	3.63	1	0.48	3.29	1	0.143	2.56	0	0.128	2.37	0	0.147	2.41	0	0.071	0	0	5.30	108.7	103,4	0
12H	1	0	0.134	2.28	0	0.082	0	0	0.078	0	0	0.092	1.51	0	0.142	2.36	0	0.076	1.54	0	6.20	95.5	89,3	1
13H	1	0	0.229	2.86	2	0.153	2.47	0	0.355	3.27	1	0.405	3.32	1	0.391	3.28	1	0.211	3.11	1	5.50	88.7	83,2	0
14H	1	0	0.103	1.53	0	0.09	1.38	0	0.079	0	0	0.091	1.43	0	0.139	2.32	0	0.081	1.87	0	6.10	88.6	82,5	0
15H	1	0	0.141	2.36	0	0.099	1.77	0	0.078	0	0	0.091	1.43	0	0.188	2.71	0	0.095	2.28	0	5.60	81.8	76,2	1
16H	0	0	0.154	2.47	0	0.081	0	0	0.073	0	0	0.086	0.59	0	0.122	2.04	0	0.078	1.70	0	5.40	90.6	85,2	1
17H	0	0	0.578	3.47	1	0.415	3.21	1	0.12	2.34	0	0.193	2.80	2	0.164	2.56	0	0.2	3.08	1	5.10	81.1	76	1

18H	0	0	0.401	3.25	1	0.195	2.69	0	0.091	1.66	0	0.087	0.91	0	0.133	2.24	0	0.14	2.78	0	6.20	84.1	77,9	2
19H	0	0	0.213	2.80	2	0.142	2.39	0	0.079	0	0	0.086	0.59	0	0.079	0	0	0.13	2.71	0	5.40	84,7	79,3	1
20H	0	0	0.655	3.54	1	0.394	3.17	1	0.127	2.42	0	0.113	2.16	0							5.50			
21H	0	0	0.558	3.45	1	0.331	3.07	1	0.099	1.96	0	0.093	1.57	0	0.093	1.72	0	0.169	2.95	1	6.20	89,7	83,5	2
22H	0	0	0.351	3.17	1	0.13	2.28	0	0.082	0	0	0.11	2.11	0	0.09	1.57	0	0.284	3.31	1	6.10	96,3	90,2	1
23H	0	0	0.422	3.29	1	0.231	2.82	2	0.102	2.04	0	0.151	2.57	0	0.155	2.62	0	0.376	3.48	1	5.80	84,7	78,9	1
24H	0	0	0.157	2.50	0	0.093	1.55	0	0.076	0	0	0.084	0	0	0.082	0	0	0.072	0.78	0	6.10	80,1	74	0
25H	0	0	0.797	3.65	1	0.488	3.30	1	0.14	2.63	0	0.175	2.72	0	0.126	2.38	0	0.326	3.40	1	6.20	82,9	76,7	0
26H	0	0	0.194	2.72	0	0.105	1.92	0	0.066	0	0	0.082	0	0	0.077	0	0	0.153	2.86	2	5.20	84,2	79	2
27H	0	0	0.244	2.91	2	0.245	2.87	2	0.078	1.31	0	0.091	1.43	0	0.108	2.13	0	0.187	3.03	1	5.60	82,8	77,2	1
28H	0	0	0.234	2.88	2	0.087	1.11	0	0.066	0	0	0.08	0	0	0.077	0	0	0.15	2.84	2	6.50	88,4	81,9	
29H	0	0	0.146	2.41	0	0.084	0.46	0	0.068	0	0	0.084	0	0	0.109	2.15	0	0.177	2.98	1	7.50	85,7	78,2	2
30H	0	0	0.106	1.68	0	0.076	0	0	0.07	0	0	0.083	0	0	0.076	0	0	0.087	2.09	0	6.80	72,5	65,7	1

LEYENDA:

Sexo:

- 0 = Macho
- 1 = Hembra.

Grupo:

- 0 = Control
- 1= Inmunizado.

DO: valores de Densidad óptica.

TA: valores de Título de anticuerpos.

RES: resultado de la prueba. Es decir:

- 0 = Negativo
- 1 = Positivo
- 2 = Sospechoso

Peso I: Peso Inicial

Peso F: Peso Final

Apéndice 2.

Resultados obtenidos mediante Kolmogorov-Smirnov de dos muestras para los valores de títulos de anticuerpos del grupo en general.

Edad en días	Grupo	Mediana del título	Promedio del título	Desviación Estándar	P- value
21	Vacunado	3.05	2.75	0.85	0.489
	Control	3.21	3.00	0.61	
46	Vacunado	2.67	2.21	1.09	0.489
	Control	2.75	2.31	1.10	
70	Vacunado	2.72	2.69	0.50	0.000
	Control	2.0	1.41	1.22	
84	Vacunado	2.83	2.80	0.53	0.000
	Control	2.1	1.68	1.00	
112	Vacunado	2.95	2.89	0.39	0.000
	Control	2.36	2.01	1.00	
145	Vacunado	3.01	2.73	0.85	0.466
	Control	2.84	2.61	0.83	

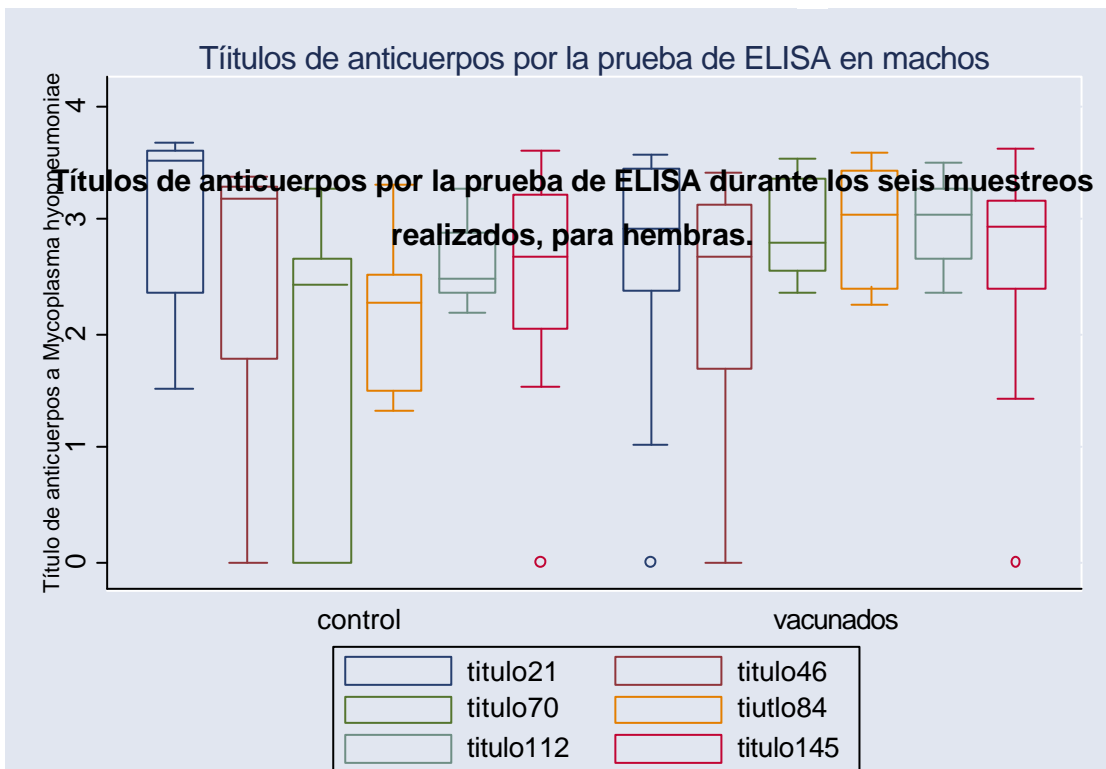
Resultados obtenidos mediante Kolmogorov –Smirnov de dos muestras para los valores de títulos de anticuerpos por sexos

Edad en días	Grupo	Mediana del título de anticuerpos	
		Hembras	Machos
21	Vacunado	3.22	2.94
	Control	2.91	3.52
46	Vacunado	2.67	2.68
	Control	2.39	3.19
70	Vacunado	2.58	2.8
	Control	0	2.44
84	Vacunado	2.81	3.04
	Control	0.91	2.28
112	Vacunado	2.75	3.03
	Control	1.88	2.49
145	Vacunado	3.01	2.95
	Control	2.905	2.67

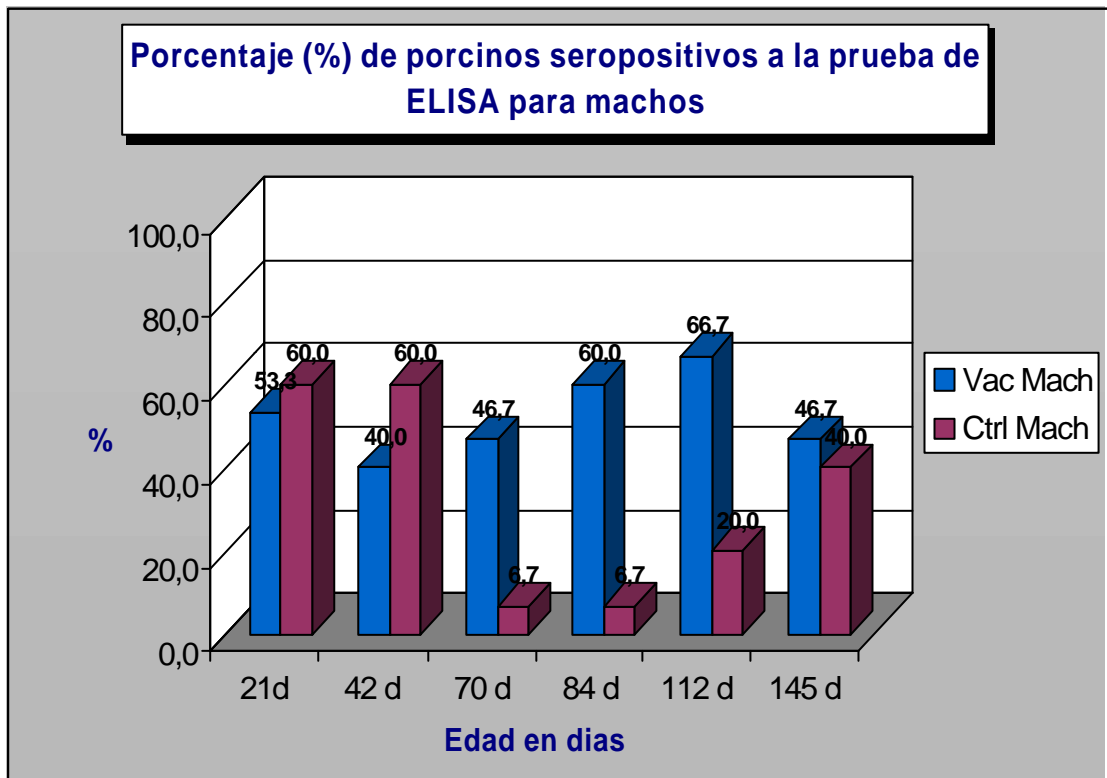
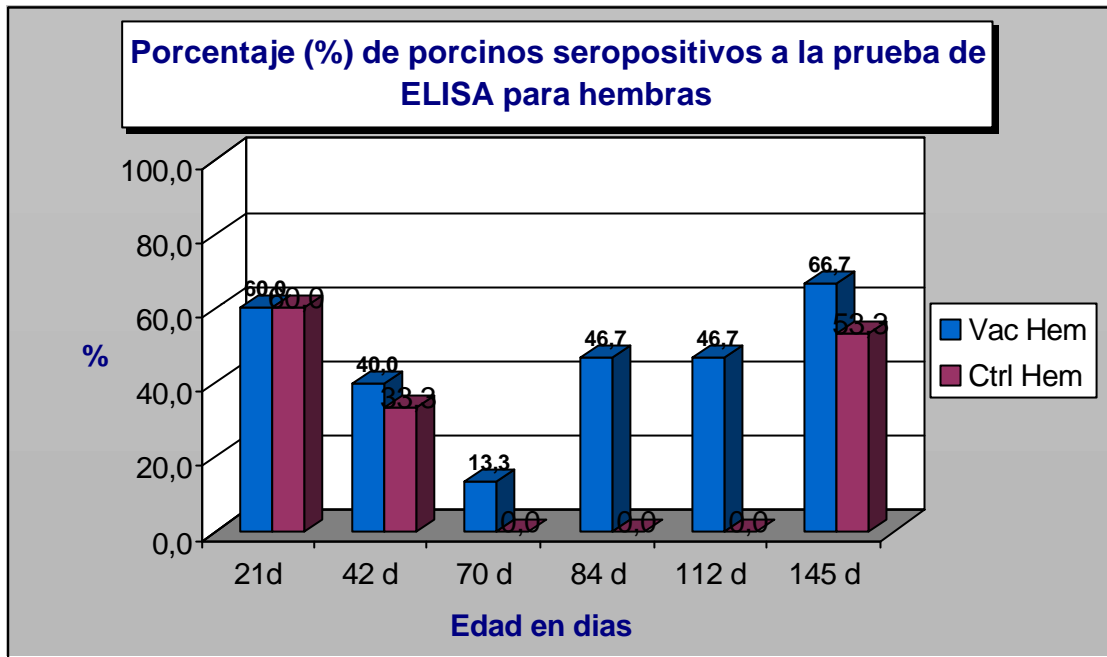
Apéndice 3.

Títulos de anticuerpos por la prueba de ELISA durante los seis muestreos realizados, para machos.

42



Apéndice 4.



Apéndice 5.

Categorías de Consolidación Pulmonar para hembras, con la prueba de Chi cuadrado.

Categoría de Consolidación	Vacunados	Control	Total
0	12	2	14
1	2	7	9
2	1	5	6
Total	15	14	29

Pearson $\chi^2(2) = 12.5678$ Pr = 0.002

Categorías de Consolidación Pulmonar para machos con la prueba de Chi cuadrado.

Categoría de Consolidación	Vacunadas	Control	Total
0	11	4	15
1	2	9	11
2	0	2	2
4	1	0	1
Total	14	15	29

Pearson $\chi^2(3) = 10.6995$ Pr = 0.013